



Maria João Monteiro Magalhães

Síntese e modificação da superfície de nanocristais semicondutores para aplicação como sondas fluorescentes em meio não-aquoso

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre
em Controlo de Qualidade

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor João Luís
Machado dos Santos

Porto

Setembro de 2014

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

Quero deixar aqui expressa uma palavra de agradecimento ao meu orientador de mestrado, Professor Doutor João Luís Machado dos Santos, pelo permanente acompanhamento ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas, e amigos, de curso pela companhia que me fizeram durante este período. Aos colegas do laboratório, nomeadamente á Sofia e ao David, pela disponibilidade que sempre tiveram para me auxiliar no que fosse preciso, e pelas boas horas de convívio também.

E, como não poderia deixar de ser, á minha família e aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e paciência e por serem tão bons comigo em todos os momentos.

Deixo também o meu agradecimento á Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e em especial ao departamento de Ciências Químicas, por todas as condições proporcionadas para a realização deste trabalho.

Resumo

O meio ambiente tem, ao longo do tempo, sofrido graves danos causados por inúmeras fontes geradoras de poluição, tornando-se a sua monitorização cada vez mais importante de modo a assegurar a proteção do ambiente e da saúde pública.

Os compostos farmacêuticos alcançam as estações de tratamento de água, principalmente após excreção ou eliminação inadequada, e, devido a métodos de tratamento insuficientes, acabam por atingir águas superficiais e subterrâneas. Os β -bloqueadores constituem uns dos grupos de fármacos mais consumidos a nível mundial, tendo sido a sua presença nos compartimentos ambientais já confirmada para concentrações que atingem alguns $\mu\text{g.L}^{-1}$.

No âmbito deste trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para a determinação do atenolol, um β -bloqueador cardiosseletivo, em formulações farmacêuticas comercialmente disponíveis no mercado nacional, perspectivando a sua aplicação numa fase posterior na monitorização deste composto em amostras ambientais. Esta metodologia usa nanocristais semicondutores, ou *quantum dots* (QDs), que são nanomateriais que apresentam características ímpares, propriedades eletrónicas e óticas únicas, dependentes do tamanho, luminescência regulável e fotoestabilidade. O método desenvolvido é baseado na capacidade do atenolol para interagir com a superfície das nanopartículas, em meio não-aquoso, provocando uma diminuição (*quenching*) da intensidade de fluorescência (IF) que depende de fatores como o tamanho e concentração dos QDs. Este procedimento requer que os QDs, inicialmente sintetizados em meio aquoso, sejam modificados de modo a que apresentem solubilidade em solventes orgânicos semelhante à do atenolol.

A funcionalização dos QDs ocorre por ligação de uma cadeia alifática ao terminal carboxílico do MPA, na superfície dos QDs, na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), que atuam como promotores da ligação amida. Só após esta conversão os QDs são capazes de interagir com o analito resultando numa diminuição da IF proporcional ao logaritmo do inverso da concentração do atenolol, obtendo-se uma zona de resposta linear para concentrações entre 0,1 e 6 mmol.L^{-1} .

O método aqui proposto pode ser visto como uma possível alternativa aos métodos atuais, devido ao seu baixo custo, simplicidade e rapidez. Como foi referido, para além da aplicação em formulações farmacêuticas este procedimento poderá apresentar a potencialidade de ser futuramente aplicado na deteção deste tipo de compostos em amostras ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: pontos quânticos; β -bloqueadores; atenolol; fluorescência.

Abstract

Throughout the years the environment has suffered from great damage, caused by endless pollution sources, which makes environment monitoring an important task in order to assure adequate environment and public health protection.

Pharmaceutical compounds can reach the wastewater treatment plants mainly through excretion and improper disposal and, because of inappropriate treatment methods, they end up reaching surface and groundwater. β -blockers are one of the most widely used pharmaceuticals, whose presence in different environmental compartments has already been confirmed in concentrations of up to a few $\mu\text{g L}^{-1}$.

In the present work, a new methodology was developed for the determination of the β -blocker atenolol in commercially available pharmaceutical formulations, anticipating its posterior application in environmental analysis. The methodology employs semiconductor nanocrystals, or quantum dots, which are recently developed nanomaterials that present unique characteristics, such as uneven, size dependent, optical and electric properties, tuneable photoluminescence and photostability.

The implemented method is based on the capacity of atenolol to establish surface interactions with the nanoparticles that result in a quenching of their fluorescence intensity. The later also depends on some factors such as size and concentration of QDs. This procedure requires QDs to be modified, after their aqueous synthesis, so that they can be solubilized in organic solvents likewise atenolol.

QDs' functionalization occurs by attachment of an aliphatic compound to the terminal carboxyl of the surface capping (MPA) in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as amide bond promoters. Following this modification, QDs are capable of interacting with the analyte resulting in a decrease of the fluorescence intensity, which is proportional to the logarithm of the inverse of atenolol's concentration. A linear working range was obtained for atenolol concentrations from 0.1 to 6 mmol.L^{-1} .

The low cost, simplicity and short analysis time make the proposed approach a worthy alternative to the available methods. Besides, this new method has the potential to be applied, in a near future, not only in pharmaceutical analysis but also in environmental monitoring.

KEYWORDS: quantum dots; β -blockers; atenolol; fluorescence

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 NANOTECNOLOGIA	1
1.1.1 NANOMATERIAIS	4
1.2 NANOTECNOLOGIA E O AMBIENTE	13
1.2.1 ÁGUA	15
1.2.2 AR	17
1.2.3 SOLO	18
2. APLICAÇÕES	19
2.1 ÁGUAS	19
2.1.1 ÁGUAS NATURAIS	19
2.1.2 ÁGUAS RESIDUAIS	22
2.2 SOLOS	25
2.3 AR	28
2.4 PLANTAS	30
3. ANALITOS	31
3.1 PRODUTOS FARMACÊUTICOS	31
3.1.1 BETA BLOQUEADORES	36
4. PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1 EQUIPAMENTO	39
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	40
4.3 MÉTODOS	41
4.3.1 SÍNTESE	41
4.3.2. CARACTERIZAÇÃO	43
4.3.3. CONVERSÃO	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	46
5.2. CONVERSÃO	49
5.2.1 OPTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO	51
5.2.2 SOLUBILIDADE	58
5.3. APLICAÇÃO	59
5.3.1 ENSAIOS PRELIMINARES	60
5.3.2. ANÁLISE QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	62
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Áreas de aplicação da Nanotecnologia	2
Figura 1.2 – Síntese <i>Top-down</i> e <i>Bottom-up</i> em Nanotecnologia	5
Figura 1.3 – Esquema do processo de excitação e emissão do QD	7
Figura 1.4 – Efeito do tamanho do QD no comprimento de onda da radiação emitida	8
Figura 1.5 – Espectro de absorção e emissão de um QD	9
Figura 1.6 - Esquema do processo de dessalinização da água	16
Figura 1.7 – Purificação do ar, por processos catalíticos	17
Figura 1.8 – Tratamento de solos, recorrendo a nanopartículas	18
Figura 2.1 - Diagrama de uma ETAR	23
Figura 2.2 - Gráfico circular das classes terapêuticas encontradas no ambiente, expressas em percentagem	32
Figura 3.1 – Estrutura química do Propanolol, Esmolol, Metoprolol e Atenolol	36
Figura 3.2 - Estrutura, fórmula química e massa molar do atenolol	38
Figura 4.1 – Esquema da síntese aquosa de QD de CdTe com <i>capping</i> de MPA. Primeira fase: formação dos precursores. Segunda fase: nucleação e crescimento dos cristais	41
Figura 4.2 – Esquema da síntese aquosa de QD de CdTe com <i>capping</i> de GSH	42
Figura 5.1 - Estrutura do MPA (a) e da GSH (b)	46
Figura 5.2 – Espectro de absorção (a) e emissão (b) normalizados, dos QDs de CdTe-GSH	47
Figura 5.3 – Espectro de absorção (a) e emissão (b) normalizados, dos QDs de CdTe-MPA	47
Figura 5.4 – Esquema do processo da alteração da superfície dos QDs	49
Figura 5.5 - Estrutura química das aminas em uso	50
Figura 5.6 – Espectro de emissão dos QDs de GSH, antes e após conversão com as aminas: (a) 1,90 nm, (b) 2,45 nm, (c) 3,33 nm	51
Figura 5.7 – Gráfico da Intensidade de Fluorescência para os três QDs de MPA (1,36, 3,17 e 3,79), após conversão com diferentes concentrações de NHS (0, 10, 20 e 50 mmol.L ⁻¹)	53
Figura 5.8 – Gráfico da Intensidade de fluorescência, dos três QDs, em relação ao número de carbonos da amina utilizada. EDC:NHS= 20:20	54
Figura 5.9 – Espectros de emissão do QD 3,17. Utilizando a hexilamina, octilamina e dodecilamina a 20, 40 e 60 mmol.L ⁻¹	55
Figura 5.10 – Espectros de emissão do QD 3,17. Utilizando a hexilamina, octilamina e dodecilamina a pH 6, 7 e 8 e sem tampão	56

Figura 5.11 – Espectro de emissão do QD 3,17, utilizando diferentes quantidades de EDC e NHS	57
Figura 5.12 - Gráfico da solubilidade do QD modificado em clorofórmio	58
Figura 5.13 – Esquema dos tipos de <i>quenching</i>	59

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Actividades de monitorização da qualidade da água	21
Tabela 2.2- Ameaças do solo e seus indicadores	26
Tabela 3.1– Indicações dos beta-bloqueadores como terapia anti-hipertensora inicial	37
Tabela 5.1 – Tabela resumo das características dos QDs sintetizados	48
Tabela 5.2 – Equação e Coeficiente de correlação das rectas de calibração $A =$ intensidade de fluorescência e $x = \text{Log}(1/C)$, em que C é a concentração de atenolol expressa em mM	62
Tabela 5.3 – Resultados obtidos na determinação do atenolol em três formulações farmacêuticas	63

Índice de Abreviaturas

- AIM - Autorização de Introdução no Mercado
- ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais
- FWHM - Largura da Banda a Meia Altura
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- Nm – nanómetro
- QD (Quantum Dot) - nanocristais
- UV - Ultra-violeta VOC – Poluentes Orgânicos Voláteis

1. Introdução

1.1 Nanotecnologia

A Nanotecnologia é a ciência que estuda os materiais a uma escala nanométrica, numa perspetiva de compreensão das suas propriedades, planeando o seu manuseamento e formas de controlo, assim como o seu potencial de aplicação. É portanto a ciência que envolve a manipulação de materiais de tamanho muito reduzido, materiais cujo tamanho varia entre 1 a 100 nanómetros (sendo que 1 nm são 10^{-9} metros), e que, por força deste tamanho reduzido, apresentam características que os tornam diferentes dos materiais comuns, possuindo por isso um atrativo especial. De facto, materiais nestas dimensões, designados de nanomateriais, possuem características físicas, químicas e biológicas únicas, que permitem aplicações inovadoras dos mesmos [1,2].

A área da tecnologia à escala nanométrica é uma área relativamente recente (com origem na segunda metade século 20) mas que tem despertado o interesse da comunidade científica um pouco por todo o mundo, uma vez que promete um aporte de vantagens significativas nas mais diversas áreas tais como, na engenharia, tecnologias de informação, saúde, ambiente e a nível farmacêutico [1].

O desenvolvimento de novos instrumentos, mais modernos, capazes e precisos, como o microscópio de varrimento por efeito de túnel, permitiu pela primeira vez a visualização ao nível molecular e atómico e isto impulsionou o desenvolvimento da Nanotecnologia. Estes avanços tecnológicos permitiram um melhor conhecimento dos fenómenos que ocorrem a esta escala e que são responsáveis pelos atributos particulares destes nanomateriais [1,2,3].

As nanociências, as nanotecnologias e os nanomateriais são abordagens inovadoras à investigação e desenvolvimento, que tem como principal objetivo controlar a estrutura e o comportamento da matéria ao nível dos átomos e moléculas. Por convenção, a Nanotecnologia utiliza partículas com 1 a 100 nm de tamanho, sendo o limite mais baixo, 1 nm, definido com base no tamanho de átomos e moléculas, e o limite mais alto 100 nm porque é à volta deste tamanho que os fenómenos, que não são observados em estruturas maiores e que os caracterizam, começam a ser observados. Baseia-se portanto na manipulação dos átomos e moléculas de modo a produzir materiais com dimensões sub-microscópicas com funcionalidades excecionais [2,4,5].

Os fenómenos responsáveis pelo diferente comportamento das nanopartículas quando comparadas com o seu material “*bulk*”, ou seja, o material convencional

macroscópico, são essencialmente fenómenos imprevisíveis de mecânica quântica, como o confinamento quântico. Nesta escala, as propriedades destes materiais dependem muito do seu tamanho. Características como o ponto de fusão, fluorescência, condutividade e reatividade, variam muito em função do tamanho da partícula. Isto leva a toda uma infinidade de novos desafios e oportunidades na área científica, e também, em termos económicos [1,2,5].

Na área da nanotecnologia podem definir-se três sectores especiais: a nanoeletrónica, a nanobiotecnologia e os nanomateriais. O próximo desafio consiste em aumentar proporcionalmente os métodos do nanofabrico para a produção em massa pela indústria [4].

Uma das vantagens deste ramo do conhecimento é a capacidade de aplicação nas mais variadas áreas tecnológicas, podendo contribuir para a resolução de muitos problemas que a sociedade atual enfrenta. Deste conjunto de aplicações é de salientar as de natureza médica, que incluem novos meios de diagnóstico, permitindo a deteção mais precoce de doenças, ou mesmo sistemas inovadores de administração orientada de medicamentos, por exemplo para células tumorais. Outras áreas de aplicação abrangem, por exemplo, as tecnologias da informação, o desenvolvimento de meios de armazenamento de elevadas quantidades dados, que ultrapassam as tecnologias atualmente disponíveis, telecomunicações, e também a investigação em alimentos, água e ambiente com vista ao desenvolvimento de ferramentas para a deteção e eliminação de contaminantes, como microrganismos e pesticidas [4].

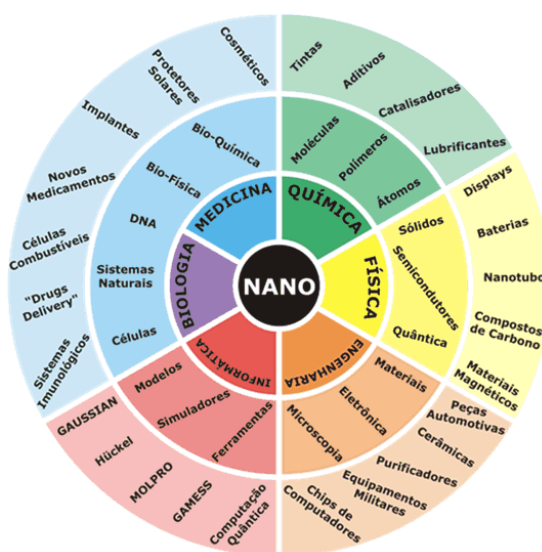


Figura 1.1 – Áreas de aplicação da Nanotecnologia [8]

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar (figura 1.1). Os cientistas de materiais, engenheiros mecânicos e eletrônicos, investigadores médicos, etc., estão a trabalhar em conjunto com químicos, físicos e biólogos devido á necessidade de partilhar e adquirir novos conhecimentos sobre ferramentas e técnicas, e sobre as interações atómicas e moleculares que os regem [4].

Esta área é atualmente defendida por alguns como a futura base da economia mundial e, de facto, vários governos tem investido muito nesta área uma vez que promete revolucionar as indústrias e melhorar a qualidade de vida [6,7].

1.1.1 Nanomateriais

A Nanotecnologia envolve a produção, recorrendo a diferentes métodos, de variados nanomateriais. Estes são desenvolvidos de modo a apresentarem características que os distingam do material *bulk* [3,9].

Segundo a Comissão Europeia, por nanomaterial, entende-se um “material natural, accidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm”. Frequentemente apenas uma ou duas dimensões estão ao nível nanométrico, como no caso dos nanotubos, mas em alguns casos todas as três dimensões podem ter apenas alguns nanómetros, como é o caso dos *quantum dots* [5,10].

Existem dois fatores principais que tornam estes materiais tão singulares: a elevada razão área de superfície/ volume e os efeitos quânticos. Estes dois aspetos são responsáveis pelo diferente comportamento destes materiais, tais como: reatividade, propriedades elétricas, magnéticas, ópticas, químicas, etc. [3,9,11].

Uma consequência da grande área de superfície destes materiais é a sua reatividade. Se, por exemplo, a superfície das nanopartículas não estiver protegida por algum tipo de revestimento ocorrem variadas interações entre as partículas. Por outro lado, a superfície destes materiais pode ser funcionalizada para o reconhecimento de um dado composto ou molécula. Para estes materiais os mais comuns conceitos da química perdem a sua validade e não se aplicam, como se verifica com as nanopartículas de ouro que são partículas altamente reativas [5].

Existem essencialmente duas abordagens principais para a síntese dos nanomateriais (figura 1.2):

- “de cima para baixo” (*top-down*)– ou seja, partindo do material em macroescala, o designado material *bulk*, e procedendo à redução do seu tamanho até à nanoescala. Este processo tem como inconveniente o facto de necessitar de elevadas quantidades dos materiais levando a maior desperdício;

- “de baixo para cima” (*bottom-up*) – é um processo mais demorado que produz nanopartículas a partir de componentes na escala atómica ou molecular [1,2].

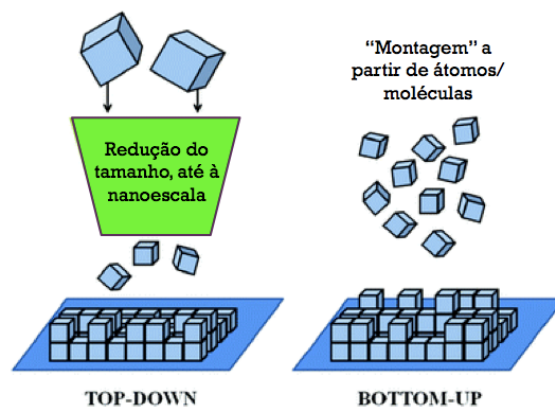


Figura 1.2 – Síntese *Top-down* e *Bottom-up* em Nanotecnologia [adaptado de 12]

As propriedades físico-químicas dos nanomateriais dependem claramente da sua morfologia tridimensional, ou seja o tamanho, a forma e a topografia da superfície, o meio circundante, e o seu arranjo espacial [5].

É necessário ainda algum trabalho em torno destes materiais de modo a melhor caracterizar e entender as suas características físico-químicas. À medida que o conhecimento e a capacidade de controlar as características dos nanomateriais melhorarem, será possível criar uma série de materiais com propriedades, funcionalidade e aplicabilidade completamente novas [3,9].

1.1.1.1 Quantum Dots

Quantum dots (QD), pontos quânticos em português, são nanocristais compostos por materiais semicondutores. É das descobertas, na área da Nanotecnologia, que mais curiosidade tem despertado devido às suas propriedades. De facto, nos últimos 20 anos têm sido alvo de extensa pesquisa científica que permitiu progressos ao nível da sua síntese bem como ao nível do conhecimento das suas propriedades óticas e eletrónicas [13,15].

A grande diferença estrutural que existe entre os QDs e os semicondutores macroscópicos é o número de átomos que entra na sua constituição. Enquanto que os últimos são estruturas macroscópicas, os QDs apresentam dimensões da ordem de grandeza de apenas algumas unidades ou dezenas de nanómetros. A nível químico os QD são cristais semicondutores de tamanho nanométrico, compostos por combinação de elementos dos grupos 11-17, grupos 12-16 ou grupos 13-15 da tabela periódica, originando materiais como CdSe, CdTe, ZnSe, CdS, InP [14-18].

Estas partículas podem ter diversas constituições, nomeadamente no que diz respeito a possuírem moléculas externas ao core semi-condutor. Acopladas ao core existem moléculas estabilizadoras, denominadas de *capping*, que asseguram a monodispersão das partículas e impedem a sua aglomeração e precipitação. Por vezes, exteriormente ao core, pode existir uma segunda “camada” semi-condutora com diferente constituição, denominada *shell*. Quando existente, esta camada tem como função, por exemplo, impedir a degradação do núcleo ou aumentar a perfeição da superfície do nanocristal, reduzindo a ocorrência de irregularidades (*traps*) e melhorando o seu rendimento quântico. É também possível a funcionalização de um QD, que consiste num processo de recobrir toda a sua superfície com moléculas que numa das extremidades estabeleçam ligações fortes com o QD, deixando a outra extremidade livre para interagir com o meio. Uma vez que rodeiam os QDs, estes ligandos têm ainda a vantagem de os estabilizar quimicamente em solução, o que se vai também refletir num aumento da sua estabilidade [18, 19].

Uma das razões principais que tem tornado estas partículas tão atrativas para as mais diversas áreas, desde a saúde até à optoelectrónica, é a sua capacidade de emitir luz após a sua excitação, e principalmente o facto de esta emissão de luz variar devido a interações dos QDs com outras moléculas com as quais reage.

Como material cristalino semiconductor que são, os quantum dots, apresentam na sua estrutura química uma banda de valência, de menor energia, equivalente ao conjunto das orbitais ligantes moleculares, e uma banda de condução, de energia superior, correspondente ao conjunto dos orbitais anti-ligantes (figura 1.3). Entre estas duas bandas existe uma região denominada *band-gap*, correspondente a níveis de energia “proibidos”, cujo diferencial energético corresponde á energia mínima necessária para promover a passagem de um elétron da banda de valência para a banda de condução. Quando se faz incidir nestes materiais fótons de energia superior à da *band-gap*, o fóton interage com um elétron da camada de valência promovendo a sua migração para a camada de condução, ao mesmo tempo que deixa, na camada de valência, uma lacuna (orbital semipreenchida) com carga positiva. A interação de natureza eletrostática entre o elétron negativo, na banda de condução e a lacuna, com carga igual à do elétron mas de sinal oposto, na banda de valência, dá origem a uma quasi-partícula, o excitão. Este excitão tem um período curto de vida acabando por perder a energia que absorveu. O processo de libertação da energia absorvida pode ocorrer de dois modos: perda não radiativa, em que a energia é dissipada pela ocorrência de choques ou geração de vibrações (este fenómeno é mais comum nos semicondutores macroscópicos), ou através da emissão de fótons com energia inferior ao fóton incidente, e portanto a um comprimento de onda maior que o do fóton absorvido [14-16].

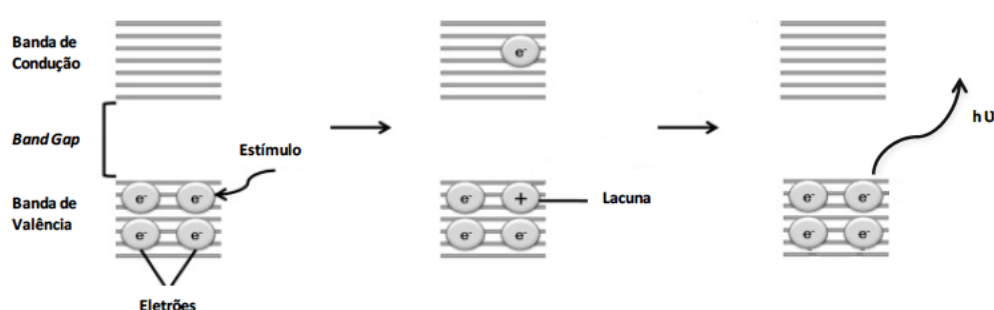


Figura 1.3 – Esquema do processo de excitação e emissão do QD [adaptado de 20]

O processo radiativo só é possível se ocorrer recombinação eletrão-lacuna, sendo este altamente dependente da ocorrência ou não de processos não radiativos na superfície do nanocristal. Estes processos não radiativos ocorrem principalmente devido a imperfeições na estrutura do cristal capazes de impedir a recombinação radiativa, causando um decréscimo da emissão. O rendimento quântico do QD, que é dado pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, num determinado intervalo de tempo, permite então avaliar a eficiência do processo de recombinação eletrão-lacuna e consequentemente os defeitos existentes na estrutura do cristal. [18]

Confinamento Quântico

Quando o tamanho do nanocristal é suficientemente pequeno, ocorre um fenómeno designado de confinamento quântico dos eletrões. À medida que o número de átomos diminui, as bandas de valência e de condução vão ficando com tão poucos níveis electrónicos, que se tornam mais parecidas com os níveis electrónicos dos átomos ou das moléculas do que com as bandas dos semicondutores, ou seja, o número de átomos no cristal é de tal modo pequeno que o rearranjo energético das orbitais moleculares é mais discreto. O espaçamento entre estes níveis, ou seja o *band-gap*, passa também a assemelhar-se mais com o *band-gap* que existe nos átomos ou moléculas do que com o dos semicondutores macroscópicos, o que faz com que o cristal possua propriedades intermediárias entre o material *bulk* e os átomos que os constituem [14,16, 18].

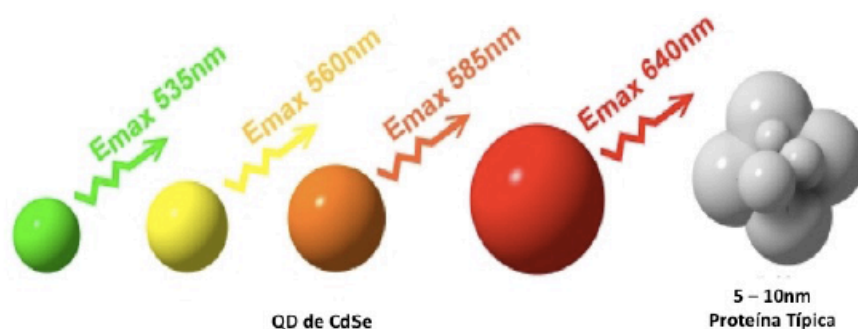


Figura 1.4 – Efeito do tamanho do QD no comprimento de onda da radiação emitida [21]

Os níveis de energia dos quantum dots são por isso discretos sendo a diferença de energia entre a camada de valência e de condução dependente do seu tamanho. Quanto mais pequeno o QD, mais evidente é o confinamento e maior a diferença de energia entre as bandas de valência e condução, resultando na emissão de radiação com comprimentos de onda mais pequenos (figura 4.1). Por outro lado, quanto mais átomos são adicionados ao cristal, maior o seu tamanho e menor o *band-gap*, que no limite é igual ao do material *bulk*. Possuindo este conhecimento é possível, ao variar o tamanho dos QD sem alterar a sua química, fazer variar algumas das suas propriedades, como as propriedades ópticas, sendo inclusive possível variar o comprimento de onda da luz que estes emitem após excitação, desde a região azul no espectro visível até mesmo ao infra-vermelho [14,16,17].

Propriedades ópticas

Estes nanocristais semicondutores são capazes de absorver fótons cuja energia seja superior à do seu *band-gap*, apresentando, no entanto, sempre o mesmo valor de emissão correspondente ao valor de energia da *band-gap*. Assim, apresentam espectros de absorção com bandas muito largas ao mesmo tempo que as suas bandas de emissão são bastante estreitas (figura 1.5) [18, 22].

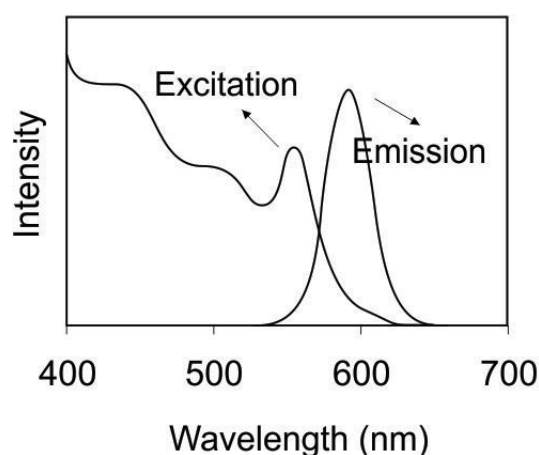


Figura 1.5 – Espectro de absorção e emissão de um QD [22]

Nos nanocristais semicondutores, a absorção de um fóton promove a excitação de um elétron da banda de valência para a banda de condução, e é o retorno deste elétron para o seu estado inicial que ocorre com libertação de energia. Este fóton emitido apresenta energia inferior á do fóton de excitação, devido á perda de energia através de processos não radiativos relacionados essencialmente com imperfeições na estrutura do cristal. A energia deste fóton é igual á energia da *band-gap* do QD. É possuindo este conhecimento que é possível, ao variar o tamanho dos QDs e, conseqüentemente, dos *band-gap* sintonizar a energia dos fótons emitidos.

O espectro de emissão dos QDs, não é tão estreito como seria de esperar, apresenta-se como uma banda relativamente larga e não como um espectro discreto, semelhante ao atómico. As bandas de emissão destas nanopartículas apresentam vulgarmente larguras de banda a meia altura (FWHM – *Full Width at Half Maximum*) de alguns nanómetros, causadas pelo facto de ser quase impossível de isolar, aquando da síntese coloidal, um único tamanho de nanocristal, pelo que o espectro representa simultaneamente as emissões de vários QDs de tamanhos muito próximos.

Síntese

Os *quantum dots* podem ser sintetizados por diferentes e variados métodos, tais como precipitação química, síntese fotoquímica, recorrendo a radiação γ ou microondas, hidrotérmica, entre outros, com propriedades dependentes da aplicação pretendida [23,24].

Entre os vários processos físicos e químicos de preparação de QD, a síntese em solução coloidal, além de ser mais acessível, é a melhor via de obtenção de nanocristais com características superficiais adequadas, com elevada eficiência de luminescência e com a capacidade de interagir com espécies seleccionadas [17].

Para a síntese destes compostos ser possível é obrigatória a presença de alguns elementos tais como os precursores, que fornecem os elementos constituintes do QD, um solvente, de natureza hidrofóbica ou hidrofílica e que determina as condições de síntese e as propriedades dos QDs e um surfactante, que funciona como agente estabilizador e passivante da superfície do QD assegurando a sua monodispersão e evitando aglomerações. No que diz respeito ao meio reacional e à hidrofiliicidade dos QDs, a sua síntese pode ser dividida em duas categorias: síntese orgânica e síntese aquosa [25].

Inicialmente os QD eram essencialmente produzidos em fase orgânica, utilizando solventes a elevadas temperaturas. Esta via de síntese permite obter

nanocristais com boas características óticas, no entanto apresenta algumas limitações como o facto de ter elevados custos, ser muito morosa e requerer condições experimentais muito rigorosas e extremas. Esta síntese envolve a injeção de uma solução de precursores num solvente de coordenação apolar, nomeadamente o óxido de trioctilfosfina (TOPO), no estado líquido e a altas temperaturas (300°C) que leva à formação instantânea de um núcleo do QD pretendido [25,26].

Quando comparada com a anterior, a síntese aquosa é mais reprodutível, mais barata, mais rápida e menos tóxica, além de que produz QDs solúveis em água e, como tal, que podem ser utilizados em sistemas biológicos, daí ser mais frequentemente utilizada. O maior problema desta síntese prende-se com o facto de ter um menor rendimento, os QDs apresentarem menor rendimento quântico, menor estabilidade e possuírem bandas de emissão mais largas, no entanto, este processo tem sido significativamente melhorado permitindo obter cristais com propriedades cada vez mais satisfatórias. A síntese aquosa envolve a junção dos precursores em meio aquoso, a pressão atmosférica, sendo realizada a menores temperaturas que a síntese orgânica [25, 27].

Síntese de QDs de CdTe

A síntese coloidal aquosa é o método frequentemente utilizado para a síntese de QD de CdTe. De um modo geral, esta síntese consiste na dissolução do Cd^{2+} e do agente estabilizador em água, ajuste do pH, e posterior adição do Te^{2-} , de modo a formarem-se os precursores dos cristais (monómeros). Sob temperaturas por volta dos 100°C, em atmosfera normal, ocorre a formação e crescimento dos QDs [25, 27].

A principal dificuldade que se coloca na preparação destes QDs é a obtenção de fontes estáveis de Te^{2-} , uma vez que o telúrio sólido, na presença de oxigénio, oxida facilmente dificultando a redução do telúrio sólido a Te^{2-} , sendo por isso necessário utilizar atmosferas inertes.

O processo mais utilizado nesta síntese passa pela utilização de borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor do telúrio sólido e pela utilização de ligandos que possuem um grupo tiol numa extremidade que se liga à superfície do QD e um outro grupo funcional na outra extremidade, que lhe permite estabelecer ligações, de acordo com a aplicação em vista [25 – 27].

Estas pequenas moléculas orgânicas, contendo grupos SH, têm vindo a ser amplamente utilizadas nestas sínteses por corresponderem a ótimos estabilizantes

destes QDs em meio aquoso. Isto deve-se ao facto de o enxofre apresentar uma grande afinidade química com os iões Cd^{2+} , pelo que, neste caso, vai fixar-se com facilidade e com eficácia na superfície dos QDs, por se ligar fortemente ao cádmio aí existente [18].

Factores como o pH e as razões molares R-SH:Cd e Cd:Te, são variáveis cruciais no rendimento do processo de síntese, inclusive na monodispersão do tamanho da população de nanocristais, sendo que estes valores dependem também da natureza do ligando usado como camada passivante ou *capping*.

Caraterização

A caraterização óptica dos QD pode ser feita através de espectroscopia de UV-Vis e fotoluminescência, que são métodos rápidos e não destrutivos. O seu tamanho, que é um factor importante e determinante das suas características, pode também ser determinado recorrendo a técnicas como a microscopia electrónica de varrimento (scanning electron microscopy - SEM), microscopia electrónica de transmissão (transmission electron microscopy - TEM), microscopia electrónica de varrimento com efeito de túnel (scanning tunneling microscopy - STM) [28].

Ao contrário dos compostos orgânicos e inorgânicos convencionais, a concentração dos nanocristais coloidais não pode ser determinada com base em métodos gravimétricos. A obtenção do espectro de absorção é o método mais prático e conveniente para determinar as características destas partículas [29].

Uma vez que as propriedades ópticas dos QDs são dependentes do seu tamanho é possível fazer parte da caraterização (tamanho e coeficiente de extinção molar) destas partículas através do estudo dos seus máximos de emissão e absorção.

Inicialmente, o seu tamanho pode ser calculado através da equação (1). Posteriormente, e já com o diâmetro da partícula determinado, procede-se ao cálculo do coeficiente de extinção molar (ϵ), através da equação (2):

$$D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1.0064)\lambda - 194.84 \quad \text{Equação 1}$$

$$\epsilon = 3450 \times \frac{1240}{\lambda} \times D^{2.4} \quad \text{Equação 2}$$

Legenda - D - diâmetro da partícula; λ - comprimento de onda máximo de absorvância; ϵ - coeficiente de extinção molar [29]

1.2 Nanotecnologia e o ambiente

O meio ambiente tem, ao longo do tempo, sofrido graves danos causados por inúmeras fontes geradoras de poluição. Processos industriais, derrame de óleo ou químicos, pesticidas, fertilizantes e as emissões de veículos, tem originado poluição no ar, água e solos. A necessidade de conseguir um ambiente limpo e não poluído, é um desafio que se tem colocado às sociedades por todo o mundo, uma vez que a longo prazo, não só a vida humana como todos os ecossistemas, poderão significativa e negativamente afetados [30].

A monitorização do ar, solo e água, para controlo de poluentes ambientais perigosos, é cada vez mais importante de modo assegurar a proteção do ambiente e da saúde pública. A monitorização *online* assume cada vez mais interesse, uma vez que permite uma deteção precoce de eventuais perigos, tendo em conta a legislação em vigor [31].

Para além do impacto, que os poluentes, naturais ou industriais, orgânicos ou inorgânicos, possam causar na saúde humana e no ambiente, existem ainda os problemas económicos e financeiros, sendo por isso essencial o desenvolvimento de metodologias que permitam o controlo em tempo real, e a determinação *in-situ* destes compostos. Um exemplo destas metodologias, são os sensores baseados em nanomateriais. Sensores químicos, baseados em nanotubos, por exemplo ou nano bio-sensores podem ser desenhados de modo a detectar variadas substâncias químicas ou biológicas [30,31].

O aumento da preocupação em torno da distribuição e impacto dos reagentes químicos dos métodos analíticos, tem conduzido ao desenvolvimento de novos métodos que permitam diminuir o uso de reagentes tóxicos, quer no tratamento da amostra quer na medição analítica [31]

É de esperar que a nanotecnologia, e as suas aplicações, tenham um impacto significativo no desenvolvimento, influenciando vários sectores industriais, incluindo a área da saúde, área alimentar, da energia, dos transportes, entre outros. A verdade é que a atividade humana é causadora de várias fontes de poluição, acabando por deixar terrenos e corpos de água impróprios para uso e, em casos extremos, destruindo ecossistemas inteiros. A nanotecnologia, tem a capacidade de ajudar a obter bons resultados em termos da melhoria ambiental, através de melhorias em tecnologias que permitam reduzir a nossa dependência em combustíveis fósseis, ou podem diretamente ajudar a purificar o ambiente [30,32].

Grandes quantidades de energia são consumidas, ao produzir e utilizar produtos, o que, para além de poder esgotar várias fontes de energias não-

renováveis, leva á libertação de poluentes danosos, para o ambiente e saúde humana. Uma das maiores contribuições que os nanomateriais podem ter, ou estarão destinados a ter, é aumentar a eficiência dos sistemas de energia, diminuindo a produção de poluentes. As propriedades únicas dos nanomateriais podem permitir aos designers e engenheiros, criar produtos, mais pequenos, que utilizem mais eficientemente a energia e que, para além disso, permitam reduzir as necessidades de energia para a produção [30].

O que se verifica, na maioria dos casos, é que as medidas de protecção do ambiente visam atenuar os efeitos adversos dos poluentes, já presentes ou recentemente libertados, para o ambiente. Estas medidas de tratamento consistem essencialmente na transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos. As propriedades dos nanomateriais, permitem melhorar estas técnicas de tratamento e remediação [30].

Existem já vários tipos de tecnologias de remediação ambiental, no entanto a purificação do ar e da água sobressaem devido á sua particular importância. Melhorias nestas áreas seriam extremamente benéficas, nomeadamente em relação a determinadas doenças que afectam várias populações por todo o mundo. Os efeitos adversos dos poluentes presentes na água e no ar, são do conhecimento quer do público em geral, como da comunidade científica e governantes. Os nanomateriais oferecem novos modos de lidar com este problema ambiental, ao permitirem melhorar a performance de tecnologias ja utilizadas, ou por oferecerem novas abordagens [30].

1.2.1 Água

Atualmente já existem vários meios de purificar a água dependendo, da sua fonte, e o uso que se lhe pretende dar, como água para consumo humano ou água para fins industriais. Processos convencionais, como a evaporação, filtração, métodos bioquímicos, funcionam mas alguns deles são muito dispendiosos, morosos ou apresentam outras limitações que os nanomateriais podem ajudar a ultrapassar [30].

Filtração por membrana – a filtração por membrana permite a remoção de partículas indesejáveis da água. Existem vários tipos de membranas desde naturais a sintéticas, de vários tipos de materiais, numa ou várias camadas e até com aditivos, como antimicrobianos, de modo a cumprirem o efeito desejado. Esta técnica, apresenta algumas limitações, como o facto de os poros não serem o suficientemente pequenos para captar algumas partículas de interesse, e a acumulação de sujidade na membrana ao longo do tempo que diminui significativamente o fluxo de água que a atravessa [30].

Os nanomateriais podem melhorar estas membranas. A incorporação de nanofibras nas membranas permite obter poros de menores dimensões, com maior capacidade de reter contaminantes mais pequenos e aumentar a sua área de superfície. As nanopartículas de dióxido de titânio, que possuem actividade catalítica, podem ser usadas de modo a causar a decomposição de muitas substâncias e bactérias, o que diminui os problemas da acumulação de resíduos nas membranas [30].

Purificadores eletrónicos – existem vários tipos de purificadores de água eletrónicos, muito úteis, por exemplo, no processo de dessalinização. Estes sistemas funcionam por absorção eletrostática dos iões. Como está representado na figura 1.6, apresentam um polo carregado negativamente (cátodo) e outro positivamente (ânodo) através dos quais a água corre e os iões são atraídos para o cátodo ou ânodo, ficando aí adsorvidos. Os nanomateriais, devido às suas propriedades elétricas e magnéticas únicas, tem a capacidade de aumentar a capacidade destes instrumentos [30].

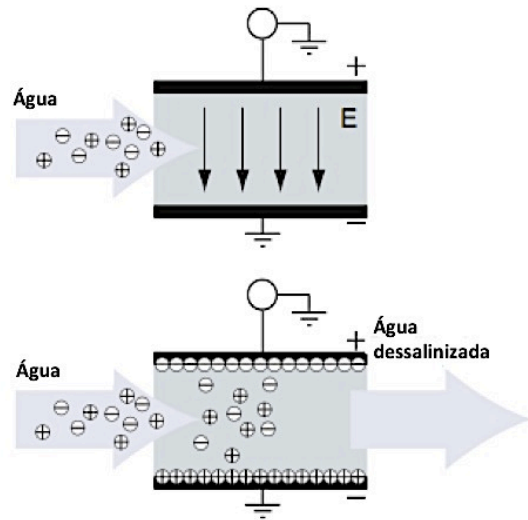


Figura 1.6 - Esquema do processo de dessalinização da água [30]

1.2.2 Ar

Assim como na purificação da água, os nanomateriais podem ajudar a limpar o ar. Fenômenos como o *smog* e os níveis de ozono, são uma consequência da poluição atmosférica causada por várias substâncias, como o azoto, dióxidos de enxofre e diversos compostos orgânicos voláteis (VOCs). Os métodos mais utilizados para melhoramento da qualidade do ar consistem em filtrações, adsorções e catálises, dependendo muito dos poluentes que são necessários remover [30].

Processos catalíticos – nestes processos os contaminantes são convertidos noutros menos tóxicos. A maior contribuição da nanotecnologia para aperfeiçoamento deste processo consiste na utilização de um semiconductor catalítico, no purificador de ar, que é exposto à luz UV de modo a produzir espécies reativas, como radicais hidroxilo, que reagem com os VOCs ou outros poluentes tornando-os inócuos. A figura 1.7 representa a purificação do ar através deste tipo de processos [30].

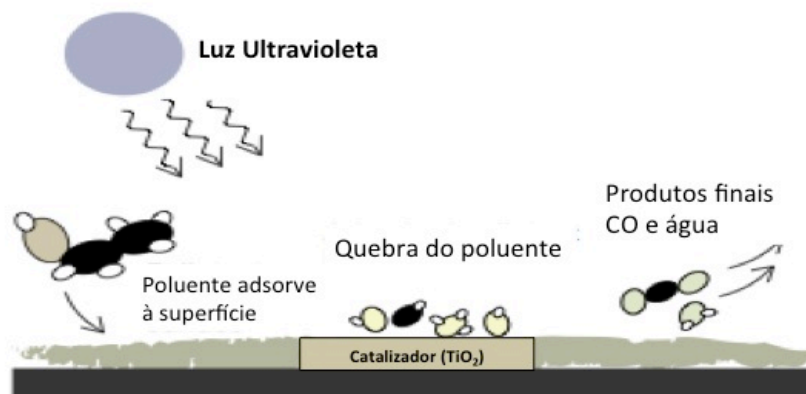


Figura 1.7 – Purificação do ar, por processos catalíticos [30]

1.2.3 Solo

A poluição dos solos e, consequentemente, das águas subterrâneas é uma realidade dos dias de hoje. Como já foi referido, as nanopartículas têm a capacidade de interagir com diversos contaminantes, removendo-os dos ecossistemas ou transformando-os em produtos menos tóxicos. O que problema que aqui se coloca é como fazer com que os nanomateriais entrem em contacto com os contaminantes que se encontram em zonas mais profundas dos solos [30].

Alguns estudos científicos já tem sido feitos no sentido de resolver este problema. A figura abaixo evidencia um desses estudos em que foram colocados, em solos contaminados, reatores contendo lamas com nanopartículas de ferro que efetivamente degradaram muitos poluentes orgânicos [30].

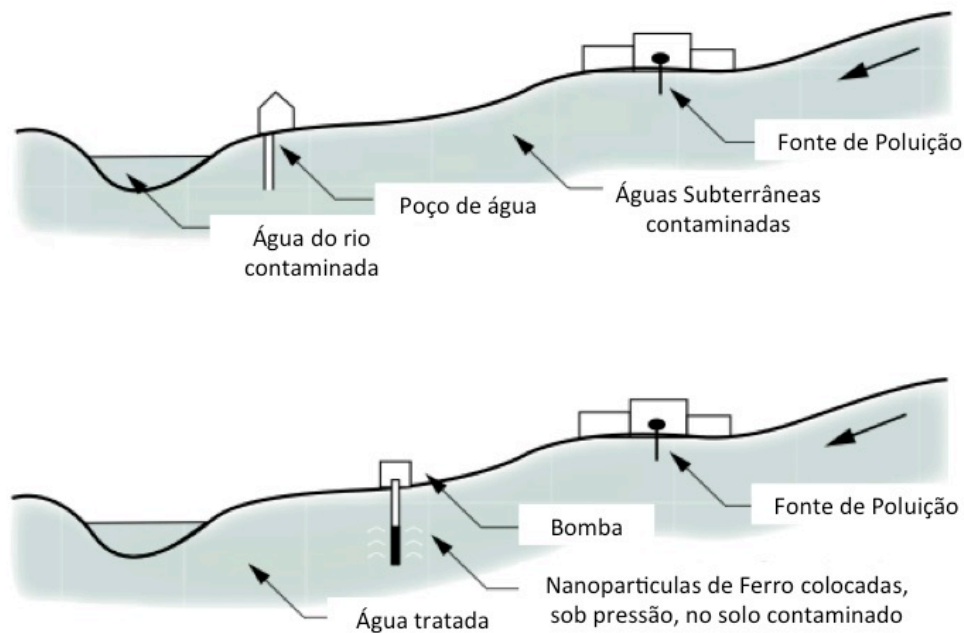


Figura 1.8 – Tratamento de solos, recorrendo a nanopartículas [30]

2. Aplicações

2.1 Águas

2.1.1 Águas Naturais

A água é um recurso natural renovável. No entanto, uma vez que o seu consumo tem excedido a sua capacidade de renovação, a sua disponibilidade atual é limitada. O que se tem verificado é uma diminuição significativa da água disponível, principalmente nos grandes centros urbanos, bem como uma diminuição da sua qualidade [33,34].

Este recurso é indispensável para o desenvolvimento socioeconómico sustentável, além de ser essencial para a própria existência humana. O aumento dos níveis de poluição, e o desperdício e má gestão deste recurso tem posto em causa a sua qualidade e disponibilidade. É necessária a existência de monitorização regular e de mecanismos, cada vez mais eficazes, que permitam tanto uma detecção como uma resposta rápida em situações de contaminação da água, de modo a assegurar a saúde pública [33-36].

De modo a satisfazer a crescente necessidade humana, em água, é importante o desenvolvimento de novas abordagens de monitorização, gestão e conservação dos recursos hídricos. É por isso cada vez mais importante a concepção de novas tecnologias capazes de permitir uma análise rápida, sensível, exata e precisa, ao mais baixo custo e de fácil implementação [35,36].

A degradação dos recursos de água tem aumentado a necessidade de determinar a qualidade da água ambiental, de modo a fornecer informação acerca de alterações causadas quer por causa natural quer, e principalmente, devido à atividade humana [35-37].

A monitorização da qualidade da água iniciou-se por volta da década de 60 e tem-se desenvolvido de modo a descrever, cada vez mais fielmente, o estado da qualidade da água. Consiste essencialmente na recolha de informação, quantitativa e representativa, acerca das suas características físicas, químicas e biológicas, ao longo do tempo e espaço. Esta monitorização deve consistir, segundo a Organização Internacional de Normalização (ISO), no processo programado de amostragem, medição e posterior registo das várias características da água, geralmente com o objetivo final de avaliar a sua conformidade [34,35,37].

A qualidade da água pode ser descrita como as concentrações e estados de alguns, ou todos, os compostos orgânicos e inorgânicos (incluindo poluentes) presentes na água, e das suas características físicas. Estas determinações são feitas por colheita e análise de amostras de água no local e no laboratório. Os resultados analíticos são posteriormente examinados, avaliados e, caso necessário, comunicados [34-37].

A conformidade da água, ou seja, o cumprimento ou não dos requisitos de qualidade, só pode ser avaliada num determinado contexto, de acordo com a utilização que se prevê para esta. Por exemplo, os requisitos de qualidade para a água de beber são diferentes daqueles definidos para água a ser utilizada na agricultura ou na indústria: a água potável não deve conter nenhum químico ou microrganismo que possa colocar em risco a saúde humana, por sua vez, águas utilizadas na agricultura devem conter baixa concentração em sódio, ou noutros compostos inorgânicos se forem para uso industrial [34,35].

É na monitorização da qualidade que se baseia a gestão da qualidade da água. A monitorização fornece um conjunto de informações que permitem tomar uma série de conclusões e decisões:

- descrever os recursos hídricos e identificar perigos reais e emergentes de poluição das águas;
- definir planos, objetivos e prioridades na gestão da água;
- desenvolver e implementar programas de gestão da qualidade da água;
- avaliar a eficácia das ações de gestão da qualidade [34,35].

O processo de monitorização da qualidade da água tem evoluído consideravelmente nos últimos anos. Numa fase inicial, por volta da década de 60, apenas se baseava em análises arbitrárias, ou seja, sem uma estratégia consistente e bem definida à partida o que conduzia à obtenção de resultados por vezes pouco significativos ou pertinentes. Atualmente esta monitorização, além de envolver mais parâmetros de análise, como a eutrofização, salinidade, contaminação microbiológica ou por metais, entre centenas de outros, também é baseada em protocolos bem definidos, adequados e adaptados ao sistema aquático em estudo. Um planeamento criterioso e lógico da metodologia a utilizar permite uma recolha mais eficiente e eficaz dos dados e, consequentemente, a obtenção de informação mais útil e relevante. Esta abordagem possibilita não só um melhor controlo ao nível da poluição da água, melhor compreensão dos ecossistemas em estudo, bem como, uma melhor gestão económica [35,37].

Tabela 2.1 - Actividades de monitorização da qualidade da água [35]

Main activity	Specific activities
1. Network design	Station locations Variable selection Sampling frequencies
2. Sample collection	Sampling techniques Field measurements Sample preservation Sampling points Sample transport
3. Laboratory analysis	Analysis techniques Operational procedures Quality control Data recording
4. Data handling	Data reception Screening and verification Storage and retrieval Reporting Dissemination
5. Data analysis	Basic summary statistics Regression analysis Water quality indices "Quality control" interpretation Time series analysis Water quality models
6. Information utilization	Information needs Reporting formats Operational procedures Utilization evaluation

Como indicado na Tabela 2.1 a monitorização envolve uma série de actividades que incluem, o planeamento do processo, amostragem, análise dos dados e utilização da informação obtida. Idealmente nestes programas de monitorização deveriam ser utilizados métodos devidamente validados, quando disponíveis.

Algumas das tecnologias convencionais usadas para a determinação rotineira de alguns parâmetros, como o pH, cloro, condutividade ou temperatura, continuam a ser as mais fiáveis, no entanto noutros casos há uma necessidade de metodologias mais robustas. Os métodos correntemente mais utilizados na análise de águas, que podem variar consoante a finalidade desta, são essencialmente métodos gravimétricos, eletroquímicos, colorimétricos e espectrofotométricos, cromatográficos e espectroscópicos [35-38].

A crescente necessidade, que já foi referida, de métodos de análise cada vez mais rápidos e específicos leva a que seja feita uma série de investigações nesse sentido. O que se tem verificado é o surgir de novas e promissoras tecnologias, que no entanto ainda estão longe de poderem ser utilizadas em larga escala. Estas tecnologias emergentes são sobretudo micro sensores, que podem ser, biológicos, capazes de detectar biomoléculas específicas enzimas e outras proteínas, ópticos, ou seja, que se baseiam nas propriedades ópticas da água ou dos analitos em causa, eletroquímicos, etc.

A grande vantagem da maioria destes sensores é que são geralmente de baixo custo, sensíveis e podem ser utilizados *in situ* [35-38].

2.1.2 Águas Residuais

As águas residuais são águas que resultam essencialmente da actividade antropogénica. A água para uso humano é captada de lagos, rios ou do subsolo e, depois de utilizada, e já contaminada, acaba por voltar a estes sítios, daí a importância do seu tratamento. Estas águas residuais são provenientes de zonas residenciais, comerciais e industriais e, devido às suas características, são rejeitadas tendo que sofrer um tratamento adequado para que possam ser reutilizadas.

É possível, em função da sua origem, distinguir quatro tipos principais destas águas:

- águas residuais de origem doméstica que resultam da actividade do metabolismo humano e de actividades domésticas, descarregadas de residências e instituições;
- águas residuais industriais, provenientes das descargas de estabelecimentos industriais, sendo as suas características função do tipo de produção;
- águas de infiltração, que consistem em água que entra no sistema de esgotos através de paredes porosas ou rachadas e tampas de esgotos;
- águas pluviais, que resultam da precipitação e consequentes cheias [39-41].

O tratamento destas águas é de grande importância na manutenção da saúde pública, no combate à poluição dos recursos hídricos e do ambiente. Nos dias de hoje, com o aumento da população mundial bem como dos níveis de poluição, é necessário a tomada de medidas que protejam o ambiente. A capacidade de controlar a poluição causada pela actividade humana é fundamental para o desenvolvimento e subsistência da humanidade e o tratamento das águas residuais é um processo importante nesse sentido. Os ecossistemas naturais tem a capacidade de se auto purificarem, os microrganismos são capazes de decompor a matéria orgânica em minerais, como nitratos e fosfatos, no entanto esta capacidade só é eficaz para níveis baixos de poluição [39,42].

O tipo de tratamento a efetuar a estas águas depende do tipo e processo de produção destas. Os tratamentos convencionais de águas residuais consistem numa combinação de processos físicos, químicos e biológicos que permitem remover sólidos, matéria orgânica e inorgânica, e microrganismos.

De um modo geral, o tratamento de águas residuais numa ETAR deve consistir em três fases essenciais, designadamente tratamento primário, secundário e terciário, que são precedidas por um tratamento preliminar, mais grosseiro que permite separar da água sólidos de grandes dimensões. O tratamento primário consiste na remoção dos flutuantes através de processos físico-químicos, recorrendo a grelhas e crivos, e separação da água residual das areias. Nesta etapa também se procede ao pré-arejamento, neutralização da carga do efluente e separação de partículas líquidas ou sólidas através de processos de floculação e sedimentação, recorrendo a sedimentadores. As lamas resultantes deste tratamento estão sujeitas a um processo de digestão anaeróbica num digestor anaeróbico ou tanque séptico. O tratamento secundário é constituído por processos biológicos seguidos de processos físico-químicos. No processo biológico podem ser utilizados dois tipos diferentes de tratamento, aeróbios ou anaeróbios. O processo físico-químico é constituído por um ou mais sedimentadores secundários. Nesta etapa é feita a sedimentação dos flocos biológicos, saindo o líquido, depois deste tratamento, isento de sólidos ou flocos biológicos. O tratamento terciário é constituído unicamente por processos físico-químicos. Nesta fase procede-se à remoção de microrganismos patogénicos através da utilização de lagoas de maturação e nitrificação. Finalmente, a água resultante é sujeita a desinfecção através da adsorção (com a utilização de carvão ativado) e, se necessário, tratamento com cloro e ozono. A figura 2.1 esquematiza o funcionamento de uma ETAR [40,43].

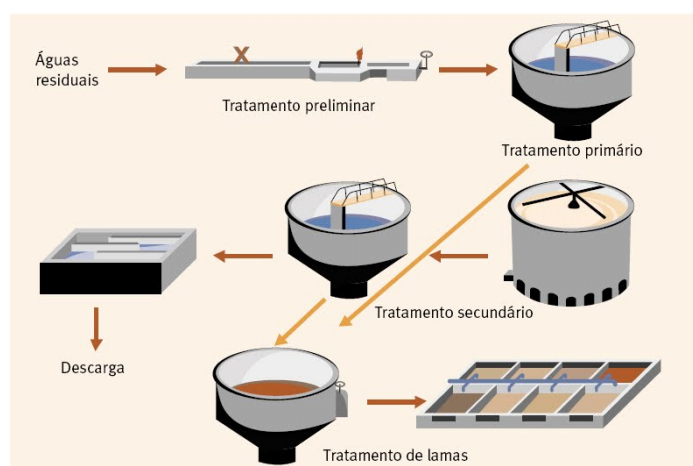


Figura 2.1 - Diagrama de uma ETAR [43]

As estações onde se efetua o tratamento destas águas estão sujeitas a variantes, como a variação sazonal da química da água, nas próprias condições de operação da estação, novas regras e diretivas ambientais, entre outros. Como tal, é necessária uma monitorização adequada que assegure que o processo de tratamento é controlado e que são obtidos os resultados desejados. Um programa de monitorização, traz alguns benefícios:

- diminuição do risco associado à ingestão de químicos em excesso;
- manutenção da conformidade com a regulamentação em vigor;
- garantia da qualidade do funcionamento da estação;
- aumento da produtividade da estação;
- poupança em gastos de água e energia.

A monitorização dos sistemas de tratamento de águas residuais pode ser feita manualmente, através de técnicos, ou continuamente e *on line*. O controlo contínuo e *on line*, com instrumentação automática, permite, em relação ao manual, uma análise mais rápida e precisa, o que é relevante tendo em conta a dinâmica das estações de tratamento de águas residuais e a necessidade de resultados de grande confiança e qualidade. Infelizmente o que ainda se verifica é que, para grande parte das determinações, além da ausência de instrumentação adequada, os procedimentos utilizados não são muito satisfatórios pois incluem uma série de processos, como amostragem, armazenamento, e análise laboratorial, que requerem muito manuseamento das amostras e como tal mais propensos a erros [41,44].

Na monitorização das águas tratadas nas ETARs, assim como na monitorização de águas naturais, o que se verifica é que os contaminantes se encontram em concentrações baixas, além de se tratarem de matrizes complexas. Portanto é necessário um tratamento prévio da amostra e métodos analíticos acoplados a detectores sensíveis e seletivos. O obstáculo que aqui se coloca é que estas técnicas analíticas requerem mão de obra especializada acabando por ser mais demoradas, caras e intensivas. Apesar do desenvolvimento da tecnologia a verdade é que, nesta área, continua a ser necessária instrumentação de monitorização que seja robusta, económica, automatizada e capaz de medir grande variedade de poluentes em concentrações muito baixas e em pouco tempo, preferencialmente sem necessidade de tratamento prévio da amostra [45].

2.2 Solos

O solo é mais um recurso natural limitado uma vez que as suas taxas de regeneração são lentas em relação á sua velocidade de degradação atual. As principais ameaças sobre o solo são a erosão, mineralização da matéria orgânica, redução da biodiversidade, contaminação, compactação e salinização.

O processo de degradação do solo constitui um problema a nível mundial, acarretando consequências ambientais, sociais e económicas. Além de ser um recurso fundamental para actividades como a agricultura, o solo funciona como fonte de matérias-primas (como argila, areias, minerais), armazena água e matéria orgânica.

É um suporte essencial dos ecossistemas, da sociedade e vida humana, sendo portanto muito importante, quer para o ambiente quer para a sociedade, garantir que as suas funções e qualidade são mantidas [46,47].

A monitorização do solo consiste na determinação sistemática das suas variáveis e na análise das suas variações ao longo do tempo e espaço. Fornece informações importantes sobre a mudança de parâmetros do solo importantes para as suas funções, como o estado dos nutrientes, matéria orgânica, biodiversidade e contaminação. É fundamental para a detecção precoce de mudanças na qualidade do solo que possam ter impacto ambiental e na saúde humana, permitindo o desenvolvimento e a aplicação de medidas que limitem os seu efeitos e assegurem a proteção do solo. Além disso, pode funcionar também como medida de eficácia de outras políticas de proteção, para sua adaptação e aperfeiçoamento [46-48].

Ao longo dos últimos anos, a qualidade dos solos tem sido um tópico que tem despertado muito interesse junto dos cientistas da área. Este interesse tem sido sobretudo na procura de uma definição para a explicar e na pesquisa de métodos que a permitam avaliar. Segundo *Karlen et al.* (1997), a qualidade do solo refere-se á capacidade do solo de exercer as suas funções, tais como assegurar a produtividade das plantas e animais, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e sustentar a saúde e habitação humana. Claro que a função de um solo depende do interesse do observador. Assim para os produtores a qualidade do solo refere-se á sua capacidade de manter ou aumentar a produtividade, para os consumidores importa a produção de produtos alimentares saudáveis e a baixo custo, para os ambientalistas interessa a capacidade de preservar a biodiversidade,

a qualidade da água e o ciclo dos nutrientes [49-51].

A qualidade do solo influencia as funções básicas do solo, tais como: o movimento e disponibilidade da água e solutos, armazenamento dos nutrientes, capacidade de filtração e tampão, imobilização e modificação de matéria orgânica e inorgânica, promoção do crescimento das raízes, etc. A capacidade de funcionamento do solo pode ser avaliada através da medição das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, ou seja, indicadores de qualidade. Existem portanto uma série de indicadores de qualidade que podem ser quantificados, no entanto é necessário fazer uma seleção, uma vez que é impraticável considera-los a todos, de modo a que reflitam corretamente o que se passa no solo. Os indicadores selecionados tem de satisfazer uma série de requisitos:

- têm de ser sensíveis ao maior número possível de agentes de degradação;
- apresentar coerência na resposta a um determinado contaminante;
- capacidade de refletir os diferentes graus de degradação;
- complementar bases de dados já existentes, caso necessário.

Os indicadores de qualidade do solo, dependendo da variação que sofrem ao longo do tempo, podem ser estáticos ou dinâmicos e a sua monitorização pode indicar se a qualidade de um solo, sujeito a um determinado uso, está a aumentar, diminuir ou se se mantém inalterada. A tabela seguinte identifica algumas das ameaças aos solos e os seus potenciais indicadores [49,50].

Tabela 2.2- Ameaças do solo e seus indicadores [50]

Soil threats	Main relevant indicators for SMN
Soil erosion	Estimated soil loss Measured soil loss
Decline of soil organic matter	Organic matter or organic carbon content Bulk density C:N ratio
Soil contamination	Heavy metal content pH Nutrients content
Soil sealing	Not relevant for SMN
Soil compaction	Bulk density Organic matter content Particle size distribution Soil water retention Saturated hydraulic conductivity Observation of soil structure
Decline of soil biodiversity	Earthworm diversity Collembola diversity Microbial respiration
Soil salinisation	Salt profile Electrical conductivity Exchangeable sodium percentage
Landslides	Not relevant for SMN
Desertification	Organic matter content Salt content Electrical conductivity

De um modo geral, os parâmetros físicos e químicos não são muito úteis uma vez que apenas sofrem modificações detetáveis quando o solo é sujeito a alterações drásticas. Por outro lado, os parâmetros biológicos são mais sensíveis a modificações ligeiras do solo, estes parâmetros incluem, por exemplo, composição e distribuição das comunidades biotas, ciclos dos bio-elementos (carbono, azoto, fósforo e enxofre), tamanho, diversidade e atividade dos microrganismos, atividade de enzimas hidrolíticas [49].

A falta de métodos de análise de referência para avaliação dos solos, aceites por todos os laboratórios, é um problema que se põe, trazendo dificuldades na interpretação e comparação dos dados. Atualmente e, uma vez que não existem métodos oficiais, o que a legislação recomenda é a utilização de testes simples (como a respiração do solo, germinação e alongamento de raízes) que não sofrem grandes alterações conforme as condições em que são aplicados [47,49].

Diferenças ao nível da recolha de amostras, armazenamento, pré-tratamento, protocolos para a determinação de parâmetros e metodologias, tornam praticamente impossível comparar dados obtidos em dois laboratórios diferentes. Para além disso, não existem valores de referência, ou seja, dados relativos a solos de elevada qualidade, que possam servir de comparação aquando da avaliação da qualidade de um solo. Tudo isto, conduz, frequentemente, a conclusões contraditórias entre diferentes investigadores [49,50].

2.3 Ar

O ar não é mais do que uma mistura de gases que compõem a atmosfera da Terra, e é composto principalmente de azoto e oxigénio, além de árgon, dióxido de carbono, metano, vapor de água entre outros, que permitem a sobrevivência das espécies na Terra.

Desde a época da Revolução Industrial, que se iniciou no século XVIII, a qualidade do ar atmosférico sofreu um grande declínio. De facto, a queima do carvão mineral que era praticada repetidamente lançava na atmosfera das cidades toneladas de poluentes. A partir deste momento, o ser humano teve que conviver com o ar poluído e com todas as consequências do progresso. Foi o sucedido na década de 1950, em Londres (o fenómeno conhecido por “*London smog*”, responsável pela morte de milhares de pessoas, devido à poluição atmosférica), que alertou os governos para as graves consequências da poluição atmosférica tendo sido a partir daí criadas uma série de diretivas e programas que visam preservar, proteger e melhorar a qualidade do ar bem como a saúde humana [52,53].

Atualmente a poluição atmosférica é devida sobretudo à emissão de gases resultantes da queima de combustíveis, que se verifica ao nível dos transportes (automóveis, comboios, navios...), em indústrias e nas habitações, para além das emissões provenientes de fontes naturais. Estes químicos, que resultam maioritariamente de actividades humanas, são emitidos e espalham-se no ambiente podendo acarretar graves consequências, tanto para a saúde humana como para os próprios ecossistemas [54,55].

Os poluentes do ar podem ser diretamente emitidos para a atmosfera, designados poluentes primários, ou podem ser formados na atmosfera por reações químicas de poluentes primários com outros componentes (como o oxigénio e água). [54].

A poluição do ar consiste numa mistura variável e muito complexa de diferentes substâncias, que podem estar sob a forma gasosa, líquida ou sólida. Várias centenas de compostos podem ser encontrados na troposfera, alguns deles potencialmente perigosos para a saúde humana.

A qualidade do ar refere-se ao estado químico da atmosfera num determinado tempo e local. A monitorização da qualidade do ar empenha-se em recolher dados acerca das emissões, concentrações, natureza e efeitos dos poluentes no ar. A recolha de dados válidos, objetivos e comparáveis em relação à qualidade do ar numa área específica permite tomar as medidas necessárias que protejam o ambiente e a saúde pública, bem como avaliar os resultados das ações

tomadas [55-57].

A avaliação da qualidade do ar é levada cabo pelas autoridades nacionais ou locais em vários países, e o seu principal objetivo é controlar e diminuir a poluição a níveis que minimizem os efeitos adversos na saúde humana e ambiente. Em algumas regiões, como é o caso da Europa, existe uma harmonização internacional em relação á monitorização e intercâmbio de dados. Na ultima década, as monitorizações do ar, têm revelado problemas de poluição atmosférica em muitas das principais cidades do mundo, sendo atualmente maior a preocupação ao nível dos países em desenvolvimento [54,57].

As atuais diretivas relativas à qualidade do ar definem critérios para vários poluentes que se podem encontrar na troposfera, tais como os limites máximos permitidos, metodologia de monitorização e procedimentos de comunicação dos resultados [53,58].

A instrumentação utilizada para avaliar a qualidade do ar pode variar muito em termos de complexidade e, conseqüentemente, em termos de preço. No entanto, no que respeita à determinação da completa distribuição da poluição e seu impacto, e na execução de sistemas de aviso, são necessários métodos de monitorização mais complexos e avançados. Os métodos adoptados devem ser métodos de referência, ou métodos validados contra estes, e podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto, dependendo da concentração e quantidade de poluentes encontrados numa determinada área [54,58].

A monitorização do ar é mais do que a simples determinação e verificação da concordância da concentração de um, ou mais, poluentes com os limites definidos. Os dados das redes de monitorização da qualidade do ar ambiental podem ser usados para avaliação da relação exposição/ impacto na saúde dos poluentes, quantificar e avaliar tendências para identificar progressos ou dificuldades, concepção de novas políticas e definição de prioridades e para informar a população acerca da qualidade do ar que respira [54].

2.4 Plantas

A vida vegetal é, por vários motivos, essencial. As plantas são o elemento biótico mais abundante na biosfera e desempenham funções críticas, a todos os níveis.

As plantas são um recurso natural fundamental para a vida na Terra, importantes a nível ecológico e económico também. São responsáveis por uma série de funções, tais como: produção de oxigénio e captação de carbono, enriquecimento dos solos, habitat de animais, retenção de nutrientes, produção de energia e bens (como fibras, madeira, produtos alimentares) além da sua utilização com fins medicinais [59,60].

Devido à capacidade que as espécies vegetais têm de captar e acumular químicos, são muitas vezes utilizadas como monitores passivos em áreas contaminadas. Por outro lado, o facto de serem extensivamente usadas em alimentos, bebidas, preparações medicinais e outros produtos (como é o caso do tabaco) requer que sejam analisadas e monitorizadas de modo a verificar a sua apetência para consumo humano [61].

Quer se trate de um estudo ambiental ou de processos de controlo de qualidade é importante que os procedimentos analíticos a utilizar sejam económicos, rápidos e simples, tendo em conta o numero de amostras que têm que ser analisadas. Apesar do crescente interesse científico nesta área, ainda não existem metodologias padrão a serem seguidas que permitam comparações ao longo do tempo e espaço, principalmente devido ao facto de que o método ótimo, ou mais indicado para uma determinada análise, varia com os objetivos da monitorização (por exemplo, os objetivos para agricultura, conservação da natureza ou planeamento urbano são bem distintos) [59-61].

3. Analitos

3.1 Produtos Farmacêuticos

Uma parcela significativa do progresso na área da medicina e dos cuidados de saúde resulta da evolução dos fármacos e/ou substâncias ativas que aumentam as oportunidades e o sucesso no tratamento de inúmeras doenças. Toneladas de compostos farmacêuticos são anualmente utilizadas em medicina, para diagnóstico, tratamento e prevenção de diferentes patologias. Estes compostos são também utilizados em animais, não só como preventivos de doenças mas, e principalmente, como promotores de crescimento [65,66].

Com a exceção dos fármacos antibacterianos e antineoplásicos, os restantes limitam-se essencialmente a controlar sintomas e não a curar. Deste modo, vários fármacos são consumidos por longos períodos de tempo e, em alguns casos, durante a maior parte da vida do utilizador [65].

Os medicamentos são formulados de modo a terem uma ação fisiológica e a resistirem à inativação antes de exercerem o seu efeito terapêutico. São estas mesmas propriedades as responsáveis pelos efeitos tóxicos e bioacumulação destes compostos nos ecossistemas terrestres e aquáticos, para além da sua continua e persistente libertação para o meio ambiente [64, 62].

Por tudo isto, a presença destes poluentes no ambiente tem suscitado o interesse da comunidade científica, nomeadamente no que concerne ao seu destino e aos efeitos tóxicos para o ambiente e seres vivos [66, 68].

As substâncias ativas dos medicamentos são moléculas complexas com diferentes ações e propriedades físicas, químicas e biológicas. São desenvolvidas e utilizadas devido à sua atividade biológica, mais ou menos específica. A maioria destas moléculas é polar e de baixo peso molecular (na ordem dos 200 a 1000 Da) e são estas que são frequentemente encontradas no ambiente. No entanto, mesmo pequenas diferenças na sua estrutura química podem alterar por completo o seu destino no ambiente, ao alterar a sua solubilidade, polaridade, etc. [68].

É de salientar que, numa forma farmacêutica, para além da substância ativa existe todo um conjunto de excipientes, como tensioativos, corantes, conservantes, etc, que, apesar de frequentemente menos importantes, também podem apresentar riscos para o ambiente. É ainda de considerar os efeitos dos meios de diagnóstico, como os meios de contraste de raio-X, e os desinfetantes que são utilizados em grandes quantidades principalmente nos hospitais [67-69].

As classes terapêuticas mais prescritas e mais frequentemente encontradas no ambiente são os analgésicos/anti-inflamatórios, dislipidêmicos, antibióticos, bloqueadores-beta, anti-epiléticos e hormonas (figura 2.2) [66,67].

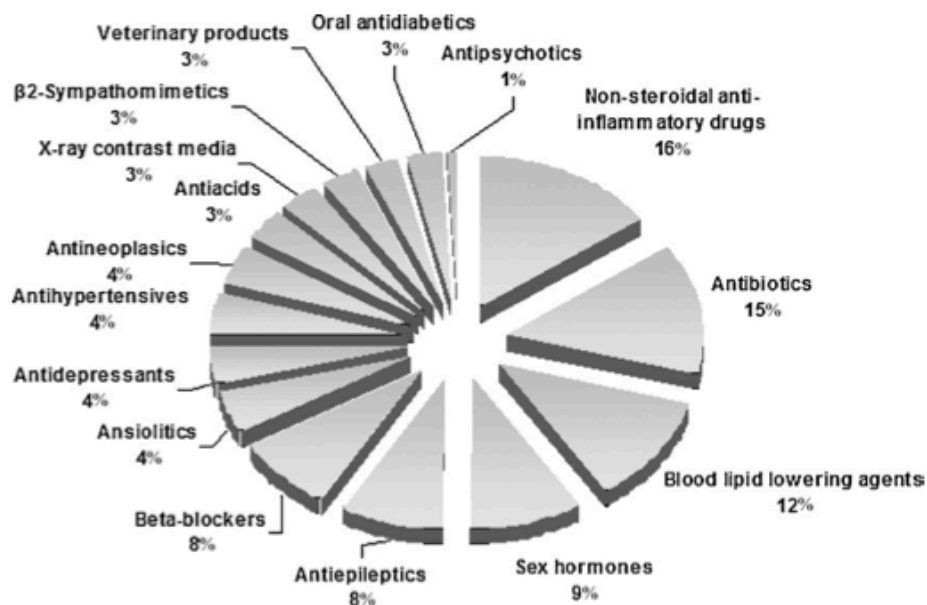


Figura 2.2 - Gráfico circular das classes terapêuticas encontradas no ambiente, expressas em percentagem [67]

Após exercer a sua ação algures no organismo humano e animal, a substância ativa será excretada através da urina ou das fezes como uma mistura contendo uma parte da substância ativa inalterada e metabolitos desta. Para vários medicamentos entre 30 a 90% da dose de substância ativa administrada é excretada na urina inalterada [70,71].

Atualmente é assumido que não apenas as substâncias ativas são importantes mas também os metabolitos resultantes de alterações estruturais decorrentes nos organismos ou no próprio ambiente. Vários princípios ativos sofrem alterações estruturais no organismo humano e animal, devido à ação de microrganismos, por exemplo, no intestino humano, ou devido à atividade de enzimas, como os citocromos. Estas alterações conduzem frequentemente à formação de compostos com menor toxicidade, havendo exceções.

Uma vez no ambiente, estas substâncias podem sofrer também alterações químicas através de uma variedade de processos bióticos, devido à ação de

microrganismos como bactérias e fungos, e não bióticos, como hidrólises e oxidações [69].

A entrada de compostos farmacêuticos no ambiente é função da combinação de vários fatores que incluem: a quantidade fabricada, a dosagem (dose, frequência e duração do tratamento), a excreção do composto-pai e seus metabolitos, processos de adsorção/absorção ao solo e a decomposição nas estações de tratamento [65].

As principais vias de entrada dos compostos farmacêuticos no ambiente os efluentes de processos de fabrico, excreções, eliminação de fármacos fora de uso ou de validade, derramamentos acidentais durante fabrico ou distribuição. Entre estes, as excreções animais são a maior fonte de contaminação ambiental por fármacos uma vez que a maioria das drogas usadas em medicina veterinária são eliminadas na urina e nas fezes que serão aproveitadas como fertilizantes naturais. Quando este adubo é espalhado nas terras, a substância ativa não metabolizada e os seus metabolitos ativos, dependendo da sua mobilidade nos solos, podem afectar os organismos terrestres e aquáticos [65].

O mesmo se verifica quando as lamas resultantes das estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são utilizadas para fertilizar os solos. Os fármacos, consumidos pelos humanos, são descarregados na rede de esgotos juntos com fezes e urina (ou mesmo medicação que esteja fora de uso ou fora de validade e que seja erradamente rejeitada para os esgotos) e direccionados para as ETARs. Durante o tratamento destes resíduos, é provável que alguns dos compostos orgânicos hidrofóbicos fiquem adsorvidos nas lamas onde acabam por se concentrar. Outros compostos podem não ser afectados por este tratamento e permanecer nas águas, que serão libertadas no ambiente aquático ou que podem posteriormente ser utilizadas para consumo humano [65,72].

Um outro problema são os aterros, onde se podem acumular lamas das ETARs, resíduos domésticos, resíduos hospitalares contaminados com fármacos. Processos de lixiviação ou escoamento destes locais podem levar à contaminação de águas subterrâneas e superficiais [62,64].

Uma outra fonte relevante de entrada de fármacos para o ambiente é a piscicultura. Os fármacos utilizados em aquacultura são lançados directamente na água e cerca de 70% destes não são aproveitados pelos peixes, ficando livres no ambiente [65,71].

A persistência de um fármaco no solo ou sedimento depende principalmente da sua foto-estabilidade, capacidade de adsorção, taxa de degradação e de lixiviação na água. Fármacos capazes de se adsorverem com eficácia tendem a permanecer nos solos e sedimentos, por outro lado, fármacos com mobilidade vão provavelmente lixiviar até às águas subterrâneas ou ser escoadas na superfície até águas superficiais [65].

O consumo de água contaminada não é o único meio de exposição do ser humano aos resíduos ambientais de fármacos. Uma outra fonte é o consumo de alimentos contaminados a partir dos resíduos ambientais. Estes contaminantes podem concentrar-se nos tecidos de organismos aquáticos ou podem ser captados por plantas de culturas que tenham sido irrigadas com água ou lamas contaminadas. Esta última situação pode também levar à contaminação de animais de consumo humano e, consequentemente, do Homem [65,71].

Os compostos farmacêuticos são desenvolvidos de modo a exercer um determinado efeito biológico, sendo por isso importantes poluentes ambientais, no que respeita o seu efeito e destino. Os modos de ação da maioria dos fármacos, em humanos ou animais, não são completamente conhecidos sendo portanto, os seus possíveis efeitos em organismos não-alvo difíceis de prever [65].

Atualmente, a quantidade de informação disponível acerca dos efeitos das substâncias ativas em organismos aquáticos e terrestres está a aumentar, mas é ainda muito escassa. As concentrações destes compostos medidas em águas superficiais estão geralmente abaixo dos valores capazes de causar toxicidade aguda nos organismos aquáticos. No entanto, uma exposição crónica a estes farmacêuticos pode levar ao desenvolvimento de efeitos mais subtis mas igualmente graves ao longo do tempo, tais como alterações metabólicas e reprodutivas em organismos não-alvo [68, 71].

Os dados acerca da toxicidade aguda destes poluentes são sobretudo devido a descargas acidentais ocorridas, uma vez que as suas concentrações ambientais são frequentemente baixas. Testes de bioacumulação e toxicidade crónica são raros, principalmente devido ao facto de o trabalho experimental que requerem ser muito complexo. No entanto, fármacos como os antineoplásicos são conhecidamente carcinogénicos e mutagénicos [67,69].

Os fármacos que tem despertado mais interesse à comunidade científica, devido aos seus efeitos ecotoxicológicos graves são os antibióticos. A introdução destes fármacos no ambiente é particularmente importante uma vez que a exposição das bactérias a estes compostos pode levar ao desenvolvimento de estirpes resistentes e, consequentemente, comprometer a saúde pública. Os resíduos de antibióticos no ambiente são também um risco para os microrganismos responsáveis por processos benéficos nos ecossistemas terrestres e aquáticos, como a desnitrificação, fixação do nitrogénio, decomposição orgânica [67,70].

Um outro aspecto importante na avaliação do risco ambiental dos compostos farmacêuticos é o facto de estes não ocorrerem isolados, ou seja, estão presentes como misturas de vários componentes (misturas de diferentes substâncias ativas, diferentes metabolitos e produtos de transformação). De um modo geral, a compreensão da

toxicidade das misturas de fármacos é limitada, apesar de ser conhecido que podem apresentar comportamentos diferentes do que o fármaco sozinho. O facto de alguns fármacos atuarem através do mesmo, ou semelhante, mecanismo de ação, partilharem o mesmo receptor ou serem metabolizados pelas mesmas enzimas, pode levar a efeitos de adição ou sinergismo [67, 68].

Análises físico-químicas já revelaram a presença de compostos farmacêuticos em vários compartimentos ambientais, tais como águas residuais, águas subterrâneas, superficiais e águas para consumo humano. Estas análises requerem equipamento altamente especializado, para além de o tempo e custo que acarretam ser igualmente elevado [73]

O método analítico mais frequentemente utilizado na determinação dos fármacos, após tratamento prévio da amostra, consiste numa separação cromatográfica, geralmente HPLC, e posterior detecção por UV e, menos comum, espectroscopia de massa ou fluorescência [65].

Todos os dias uma quantidade crescente de compostos de origem farmacêutica são libertados para o ambiente, por todo o mundo. Ainda assim, existe uma falha na legislação, no que diz respeito à contaminação ambiental por estes compostos, principalmente devido à falta de dados que permitam quantificar os níveis de contaminação e os seus efeitos. Atualmente, na União Europeia, para a introdução de um novo medicamento, humano ou animal, no mercado é obrigatória uma avaliação dos riscos ambientais do composto. No entanto, o impacto ambiental não fornece motivos suficientes para que a AIM seja recusada [67,71].

Pode no entanto tentar reduzir-se a presença destes compostos no ambiente recorrendo a diferentes estratégias. Estas estratégias incluem: melhoramento das estações de tratamento de águas, educação dos médicos para diminuir as prescrições, desenvolvimento de programas de entrega de medicamentos fora de uso ou de validade e educação e sensibilização dos consumidores [68].

3.1.1 Beta Bloqueadores

Os bloqueadores beta-adrenérgicos constituem uma classe terapêutica que apresenta como mecanismo de ação o bloqueio dos recetores beta-adrenérgicos, parte do sistema nervoso simpático. Após a sua descoberta, rapidamente se tornaram no grupo de medicamentos mais utilizado para o tratamento da doença coronária, sendo considerados como uma das mais importantes descobertas da farmacologia e da medicina do século XX [74, 75].

Este grupo de fármacos, prescritos com frequência, atuam essencialmente ao nível do sistema cardiovascular. Competem com as catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, para os seus recetores impedindo a sua atuação, inibindo assim as respostas cronotrópicas, inotrópicas e vasoconstritoras [74].

Dentro deste grupo é possível distinguir duas categorias: os que são seletivos para os recetores adrenérgicos β_1 , que são recetores que existem principalmente no coração, como é o caso do atenolol, bisoprolol e metoprolol, e os que são beta-bloqueadores não seletivos, ou seja, que atuam tanto nos recetores β_1 como nos β_2 , como o propranolol, nadolol e carvedilol. O problema com este ultimo grupo prende-se com o facto de os recetores β_2 serem vasculares e pulmonares e portanto a sua inibição causar efeitos periféricos indesejados, como a broncoconstrição [74].

A figura 3.1, demonstra a estrutura química de quatro destes compostos farmacêuticos.

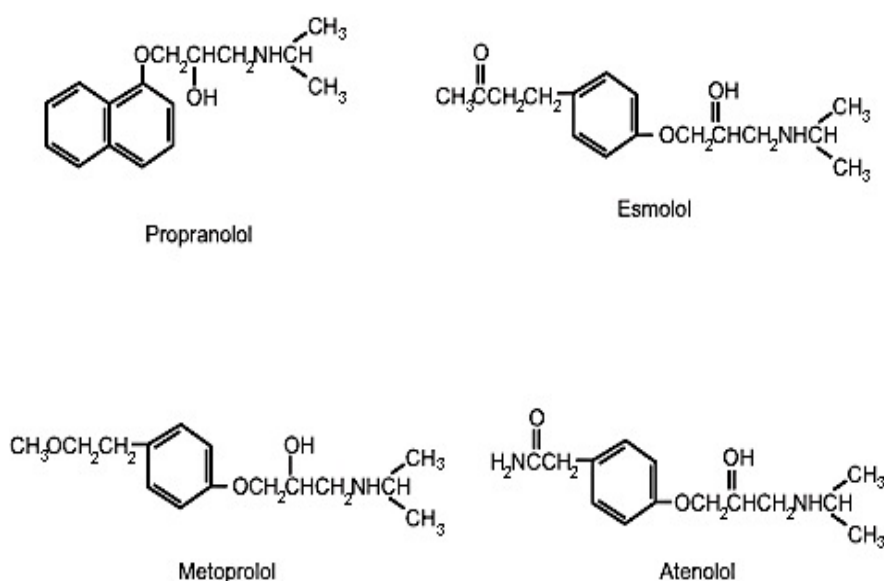


Figura 3.1 – Estrutura química do Propranolol, Esmolol, Metoprolol e Atenolol [76]

Atualmente os betabloqueadores adrenérgicos constituem a primeira opção terapêutica na hipertensão arterial associada à doença coronária, às arritmias cardíacas, à enxaqueca, entre outras (tabela 3) [74,77].

Tabela 3.1 – Indicações dos beta-bloqueadores como terapia anti-hipertensora inicial

Angina estável
Infarto do miocárdio prévio
Insuficiência cardíaca diastólica e sistólica
Enxaqueca
Estado hiperadrenérgico (atividade simpática aumentada)
Aneurisma de aorta sob tratamento clínico conservador
Arritmias supraventriculares

Além do uso humano deste grupo de fármacos, eles são também usados em medicina veterinária e ilegalmente como agente de doping em alguns desportos.

Esta classe de fármacos é de facto muito utilizada e existem alguns dados que expressam isso mesmo: em 1999, o consumo de propranolol em França excedeu as 35 toneladas; na Alemanha o consumo desta classe atinge as 100 a 250 toneladas por ano; nos Estados Unidos, vários destes compostos estão entre os 200 medicamentos mais prescritos. Estas taxas de consumo elevadas, quer por humanos quer em medicina veterinária, associado ao seu metabolismo incompleto nos organismos e a métodos de tratamento de água e resíduos incapazes de remover totalmente estes compostos, tem conduzido ao seu aparecimento nos compartimentos ambientais terrestres e aquáticos em níveis que vão desde alguns ng.L^{-1} a μL^{-1} . Apesar de estes valores não parecem, numa primeira análise, muito significantes é necessário ter em conta que estes compostos foram criados de modo a serem biologicamente ativos. Além disso a maior parte dos fármacos pertencentes a este grupo apresentam um intervalo terapêutico estreito, ou seja, a diferença entre a dose terapêutica mais baixa e a dose terapêutica máxima tolerável é muito pequena [77-78].

Estudos recentes demostram que estes fármacos dificilmente ficam imobilizados nos solos acabando por atingir águas superficiais e subterrâneas, onde apresentam elevada estabilidade hidrolítica com tempos de semivida superiores a um ano, acabando por se acumular nestes compartimentos. A sua presença no ambiente pode levar então a efeitos indesejáveis nos diferentes organismos. De facto, a presença de receptores beta-adrenérgicos em peixes e outros seres aquáticos, torna-os susceptíveis de serem afetados pela presença destes compostos no ambiente [78, 79, 81].

3.1.1.1 Atenolol

O atenolol, quimicamente designado de 2-[4-(2-Hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)fenil] acetamida, é um fármaco pertencente ao grupo dos β -bloqueadores cardioseletivos. Foi desenvolvido por *Barret* e seus colaboradores, da Imperial Chemical House Limited, e patenteado em 1970 [82].

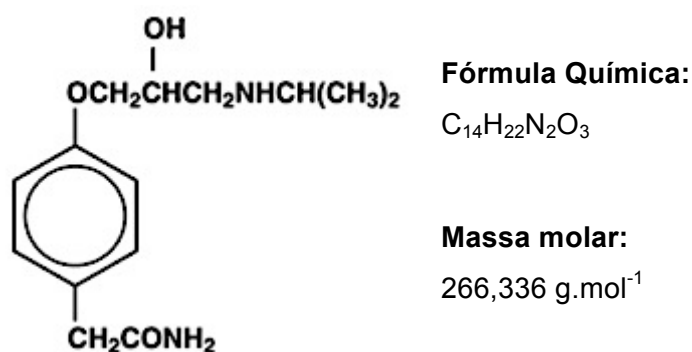


Figura 3.2 - Estrutura, fórmula química e massa molar do atenolol [80]

Este composto está disponível no mercado sob a forma de comprimido, de 25, 50 e 100 mg. É essencialmente eliminado por via renal (50% da dose é eliminada em 24 horas), sem grande metabolização hepática. Os efeitos adversos mais comuns relacionados com o uso deste fármaco são bradicardia, fadiga, perturbações gastrointestinais e do sono. Os sintomas de sobredosagem podem incluir hipotensão, insuficiência cardíaca aguda e broncospasmo.

É por estes motivos que a análise do atenolol é de grande importância em investigação farmacêutica e clínica [80, 83].

Atualmente a maioria dos métodos existentes para a determinação do atenolol em formas farmacêuticas, ou em fluidos biológicos, consistem em técnicas cromatográficas. Os problemas que se colocam com o uso destas técnicas incluem a necessidade de derivatização, longos processos de extração, além de ser uma técnica que requer instrumentação de elevado custo [83, 84].

4. Parte Experimental

4.1 Equipamento

A água ultra-pura utilizada para a preparação de soluções foi obtida através de um sistema de ultra-purificação de água, da marca Milli-Q, (Millipore, Bedford, MA, EUA). Para a pesagem dos reagentes sólidos foi utilizada uma balança analítica (modelo AG 285, Mettler, Toledo).

Para a preparação de soluções de concentração rigorosa foi utilizado material de vidro classe A, sendo a medição de volumes inferiores a 5 mL efectuadas recorrendo a micropipetas de volumes reguláveis.

Para leitura dos espectros de absorção e emissão foram utilizados um espectrofotómetro Jasco V-660 Septofotometere e um fluorímetro Jasco FP-6500 Septrofluorometer, respectivamente. As medições de pH foram efectuadas com um pHmetro PHS-3C e as centrifugações com uma centrifuga multifunções Jouan B4i.

No tratamento das amostras, foi necessário recorrer a um banho de ultrassons, utilizando para o efeito um modelo VWR Signature 75D.

4.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados possuíam todos qualidade analítica ou semelhante, sendo usados sem qualquer tipo de tratamento ou purificação. Durante todos os processos a água utilizada foi água ultra-pura.

Para a síntese dos QDs foram utilizados os seguintes reagentes: telúrio em pó (Te), tetrahidroborato de sódio (NaBH_4), cloreto de cádmio (CdCl_2), telurito de sódio (Na_2TeO_3), e glutatona (GSH), obtidos da Sigma-Aldrich[®]. O ácido mercaptopropiônico (MPA), o citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) foram adquiridos na Fluka[®] e o etanol absoluto na Panreac[®].

No processo de conversão dos QDs, foram utilizadas as aminas: butilamina ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$), hexilamina ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$), octilamina ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$), dodecilamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}$), hexadecilamina ($\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{N}$), octadecilamina ($\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{N}$) e oleilamina ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$), todas elas adquiridas da Sigma-Aldrich[®], e acetona e clorofórmio do VWRChemicals[®] para preparar as respectivas soluções. O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e o NHS (N-hidroxisuccinimida) foram também obtidos da Sigma-Aldrich[®].

Para a análise química foi utilizado atenolol (Sigma-Aldrich[®]) e clorofórmio (VWRChemicals[®]), para preparar uma solução mãe a partir da qual se prepararam as soluções a analisar por diluição em clorofórmio. As amostras a estudar consistiram de três formulações comerciais (Tenormim, Tenormim Mite e Atenolol Ratiopharm).

4.3 Métodos

4.3.1 Síntese

4.3.1.1 Síntese de QD com capping de MPA – síntese ultra-rápida [25]

Para a síntese do precursor NaHTe, uma quantidade de telúrio em pó é colocada num balão de tubuladura dupla, com excesso de NaBH_4 , sendo todo o ar do sistema removido com corrente de azoto. Posteriormente é adicionada água desoxigenada, e a mistura aquecida a 80°C , sempre sob atmosfera de azoto, até que a solução adquira uma cor violeta.

Num segundo balão, de tubuladura tripla, é misturada uma solução 2mM de CdCl_2 com uma solução 3,4mM de MPA. O pH da mistura é ajustado até 11,8 (com NaOH 1,0M) e é colocada sob corrente de azoto.

A solução de NaHTe previamente obtida é então transferida, através de uma bomba peristáltica, para este segundo balão que será posteriormente aquecida a 100°C sob refluxo, em atmosfera normal, permitindo a síntese dos QDs.

O ratio molar entre $\text{Cd}^{2+}:\text{Te}^{2-}:\text{MPA}$ é 1:0,1:1,7, e o tamanho dos QDs é controlado ao variar o tempo de refluxo.

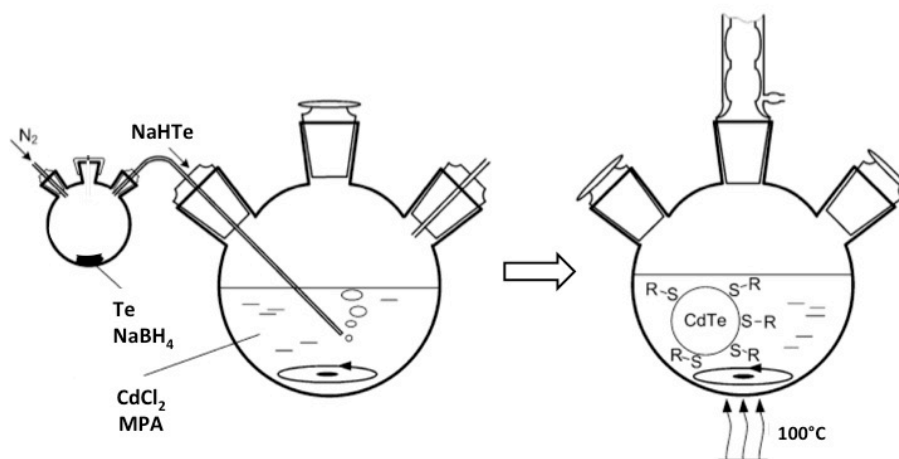


Figura 4.1 – Esquema da síntese aquosa de QD de CdTe com capping de MPA.

Primeira fase: formação dos precursores

Segunda fase: nucleação e crescimento dos cristais [85]

4.3.1.2 Síntese de QD com capping de GSH – síntese “one-step” [27]

Esta síntese, ao contrário da anterior, é realizada apenas numa etapa, sendo mais simples.

Num balão de tubuladura tripla, é colocada a solução de CdCl_2 (0,25 mmol em 25 mL de água), sendo posteriormente adicionados o GSH (0,3 mmol), o citrato de sódio, o Na_2TeO_3 e o NaBH_4 (0,24 mmol) e o pH ajustado até 10,5 com NaOH 1M. As razões molares entre Cd^{2+} , TeO_3^{2-} e GSH são 5:1:6.

Esta mistura é então aquecida a 100°C sob refluxo, em atmosfera normal, iniciando-se a partir daí o crescimento dos QDs. Os três tamanhos diferentes de QDs são obtidos variando o tempo de refluxo.

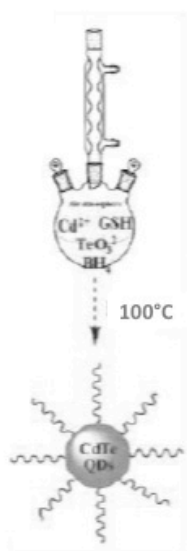


Figura 4.2 – Esquema da síntese aquosa de QD de CdTe com capping de GSH [27]

Após a síntese dos QD, o procedimento seguinte é comum aos dois tipos de QD independentemente do *capping*. Às soluções finais com os QDs foi adicionado etanol absoluto em quantidade suficiente para que ocorresse a sua precipitação. A mistura final foi centrifugada, a 4000 rpm, para separação dos QDs que se depositaram e posteriormente foram secos em vácuo.

4.3.2. Caracterização

Após a síntese das partículas, estas foram caracterizadas. Para tal procedeu-se á obtenção do espectro de absorção e emissão dos QDs dissolvidos em água, e foi posteriormente calculado o seu tamanho e coeficiente de extinção molar recorrendo às equações 1 e 2.

4.3.3. Conversão

Os QDs conjugados com aminas foram preparados através da modificação da sua superfície por estabelecimento de uma ligação amida (entre o grupo carboxílico do MPA ou GSH e o grupo amina), usando EDC e NHS como promotores da reação. 500 µL de solução de QD foi ativada com 500 µL de EDC (20mM) e 500 µL de NHS (20mM). Após incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de amina à mistura anterior. A solução foi deixada a reagir por mais 120 minutos. O excesso de reagentes foi removido das nanopartículas por ultracentrifugação e posterior purificação com três ciclos de lavagem/centrifugação com água. Os QDs assim obtidos foram levados a secar em vácuo. Este procedimento foi repetido para cada uma das aminas testadas (butilamina, hexilamina, octilamina, dodecilamina, hexadecilamina, octadecilamina e oleilamina) [86].

Esta metodologia foi otimizada, para os QDs em uso, fazendo variar alguns dos seus parâmetros como: tempo de incubação, concentração de EDC, NHS e amina, e pH.

Após este procedimento foi traçado o espectro de emissão e absorção dos QDs.

4.3.4. Aplicação

Para a análise química uma solução de atenolol 11 mmol.L^{-1} , foi preparada através da dissolução de 58,59 mg de atenolol (Sigma-Aldrich®, 98%) em 20 mL de clorofórmio. As soluções padrão de atenolol foram preparadas por diluições apropriadas desta solução mãe.

Para a análise das amostras a estudar, efetuou-se a pesagem, e posterior pulverização em almofariz, de um numero representativo de comprimidos de cada formulação comercial (Tenormim 100 mg, Tenormim Mite 50 mg e Atenolol Ratiopharm 50 mg). Posteriormente, uma quantidade adequada de comprimidos foi dissolvida num volume rigoroso de clorofórmio, colocado em banho de ultrassons e filtrado por gravidade.

Numa célula de quartzo, de 1 cm, foi sequencialmente adicionada uma alíquota da solução de QD ($0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$), e de solução padrão de modo a obter concentrações de atenolol entre 0,1 e 6 mM. O volume foi ajustado até 1,5 mL com clorofórmio. A intensidade de fluorescência das soluções obtidas foi determinada, fixando o comprimento de onda de excitação, em quatro ciclos de cinco minutos e foi traçada a curva de calibração.

A análise de cada amostra, foi efectuada do mesmo modo que os padrões e as suas concentrações calculadas a partir da curva de calibração.

5. Resultados e discussão

5.1. Síntese e Caracterização

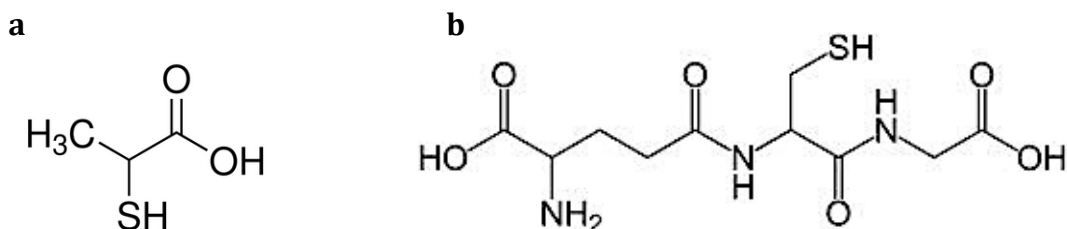


Figura 5.1 - Estrutura do MPA (a) e da GSH (b) [18]

A figura anterior apresenta a estrutura química do MPA e do GSH. Ambos os ligandos possuem um grupo tiol ($-\text{SH}$), a partir do qual se ligam ao núcleo do QD. Para além deste grupo funcional, a molécula de MPA apresenta um grupo carboxílico numa outra extremidade, e é este grupo que torna o QD solúvel em água e permite que ele possa interagir com o meio.

A molécula de GSH contém, não um, mas dois grupos carboxílicos além de ter azoto na sua constituição, apresentando por isso uma massa molar bastante superior á do MPA. Os ácidos carboxílicos têm sido dos compostos mais amplamente utilizados por conferirem elevada estabilidade coloidal às nanopartículas devido ás cargas repulsivas e devido á sua facilidade de conjugação.

Ao longo do processo de síntese é possível confirmar que tempos mais longos de reação permitem obter QDs maiores e, conseqüentemente, com maiores comprimentos de onda máximos de emissão. Os espectros de absorção por sua vez, demonstram que o aumento do tamanho do QD é acompanhado por perda da definição do pico.

Os espectros dos diferentes QDs sintetizados, são demonstrados seguidamente.

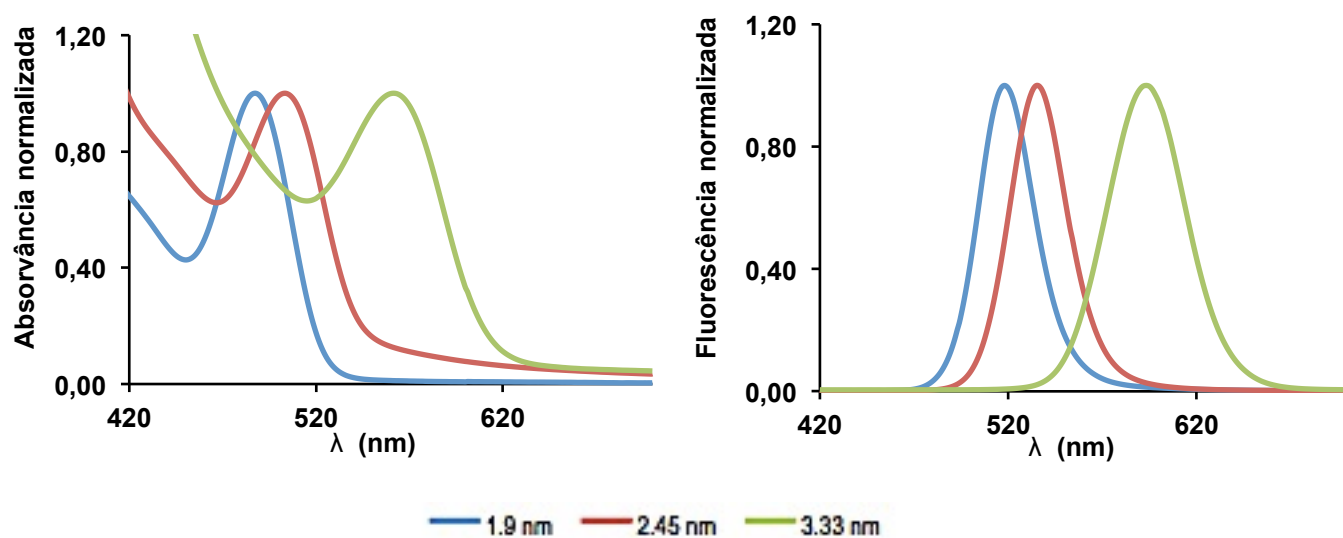


Figura 5.2 – Espectro de absorção (a) e emissão (b) normalizados, dos QDs de CDTe-GSH

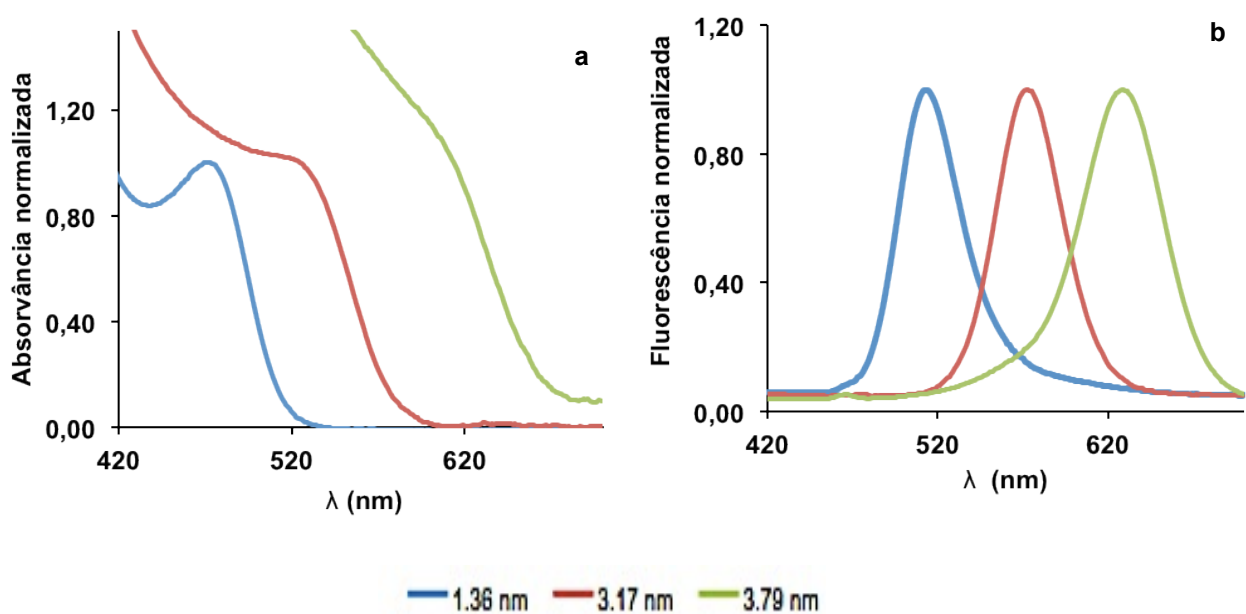


Figura 5.3 – Espectro de absorção (a) e emissão (b) normalizados, dos QDs de CDTe-MPA

Todos os nanocristais apresentam um pico de absorção bem definido e um espectro de emissão simétrico e estreito, com valores de FWHM entre 35 e 56,

evidenciando que os QDs são relativamente homogêneos. O diâmetro médio (D) dos QDs foi calculado recorrendo á equação 1,

$$D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1.0064)\lambda - 194.84$$

sendo λ o comprimento de onda de máxima absorvância.

A concentração molar de cada QD, em solução aquosa, é determinada a partir do espectro de absorção de uma solução de QD, de concentração mássica conhecida, após o calculo do seu coeficiente de extinção molar (ϵ), usando a equação 2:

$$\epsilon = 3450 \times \frac{1240}{\lambda} \times D^{2.4}$$

sabendo ϵ e a absorvância da solução de QD, a concentração molar é facilmente calculada aplicando a lei de Lambert-Beer.

A tabela abaixo resume algumas das características dos seis QDs sintetizados:

Tabela 5.1 – Tabela resumo das características dos QDs sintetizados

QD	Tamanho (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ absorção (nm)	λ emissão (nm)	FWHM (nm)
MPA	1,36	18877,4	472	513	43,3
	3,17	125290,4	544	572	50,1
	3,79	171025,7	614	629	55,8
GSH	1,90	40538,7	485,5	510	35,9
	2,45	71250,4	503	530	39,3
	3,33	137467,2	559	593	49,6

5.2. Conversão

No processo de modificação da superfície dos QDs as moléculas de amina ligam-se através do estabelecimento de uma ligação amida com o grupo carboxílico dos nanocristais, segundo o seguinte esquema:

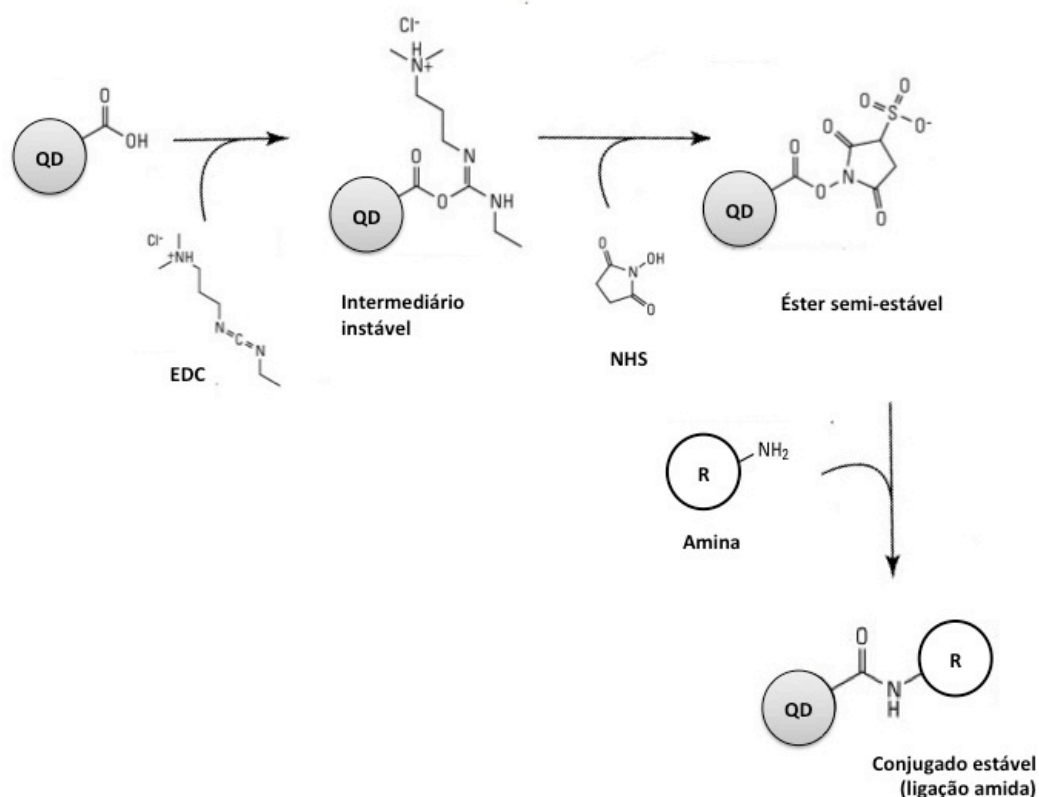


Figura 5.4 – Esquema do processo da alteração da superfície dos QDs [adaptado de 87]

O EDC reage com o grupo carboxílico formando um intermediário ativo. Este intermediário facilmente sofre ataque nucleofílico de aminas primárias que existam na reação, estabelecendo-se uma ligação amida entre o grupo carboxílico original e o grupo amina, enquanto o produto de reação do EDC é libertado como um derivado solúvel da ureia.

O NHS, apesar de não ser um composto essencial na ocorrência de reações carbodiimida, o seu uso permite, segundo a literatura, aumentar significativamente a eficiência da reação. Com introdução deste reagente, a reação ocorre em duas etapas: a ativação do composto por formação de um éster do NHS e a reação deste éster com a amina.

Alguns parâmetros deste processo de modificação da superfície dos QDs foram avaliados de modo a otimizar o método. Fatores como o tempo de reação, a concentração de EDC e NHS e a sua proporção, as aminas e a sua concentração e o pH foram testados.

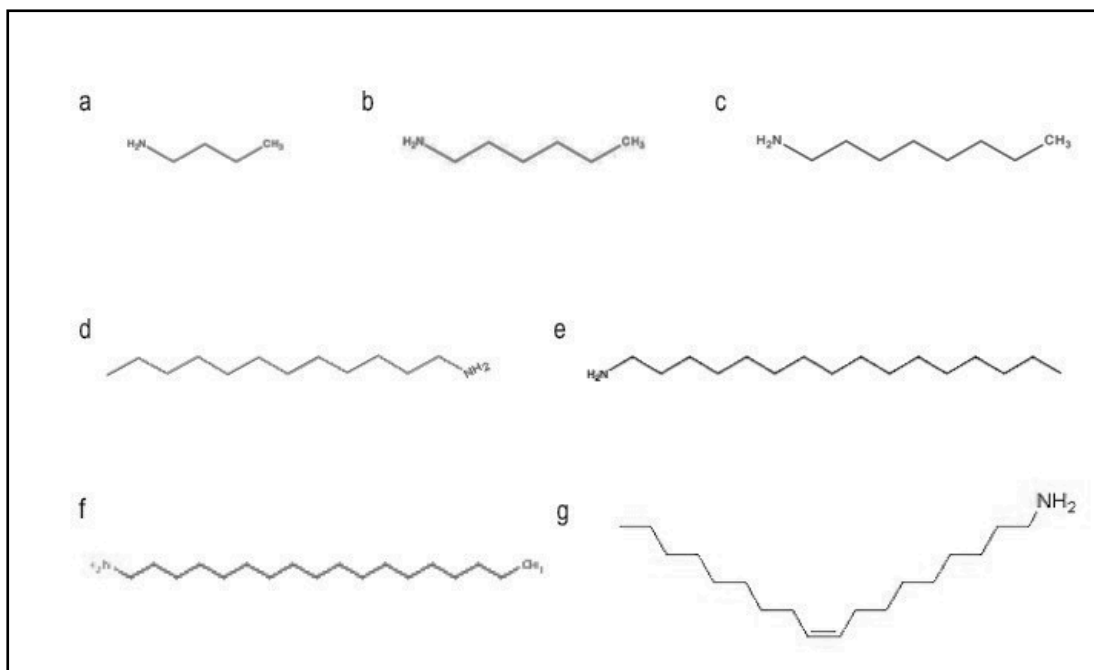


Figura 5.5 - Estrutura química das aminas em uso: a- butilamina ($C_4H_{11}N$), b- hexilamina ($C_6H_{15}N$), c- octilamina ($C_8H_{19}N$), d- dodecilamina ($C_{12}H_{27}N$), e- hexadecilamina ($C_{16}H_{35}N$), f- octadecilamina ($C_{18}H_{39}N$) e g- oleilamina ($C_{18}H_{37}N$)

5.2.1 Optimização da reação

Durante o desenvolvimento deste processo foram realizados alguns estudos com o objetivo de o otimizar, tomando como critério a maximização do sinal analítico, ou seja, da fluorescência.

Em relação aos QDs de GSH sintetizados foi imediatamente possível verificar que, após a reação de modificação da sua superfície, ocorria uma perda bastante significativa da intensidade de fluorescência, como é possível verificar nos gráficos da figura 5.6. Esta diminuição pode ser devida a alterações que ocorrem ao nível da superfície dos QDs, que levam a perdas de energia não radiativas, enfraquecendo a emissão fotoluminescente dos nanocristais.

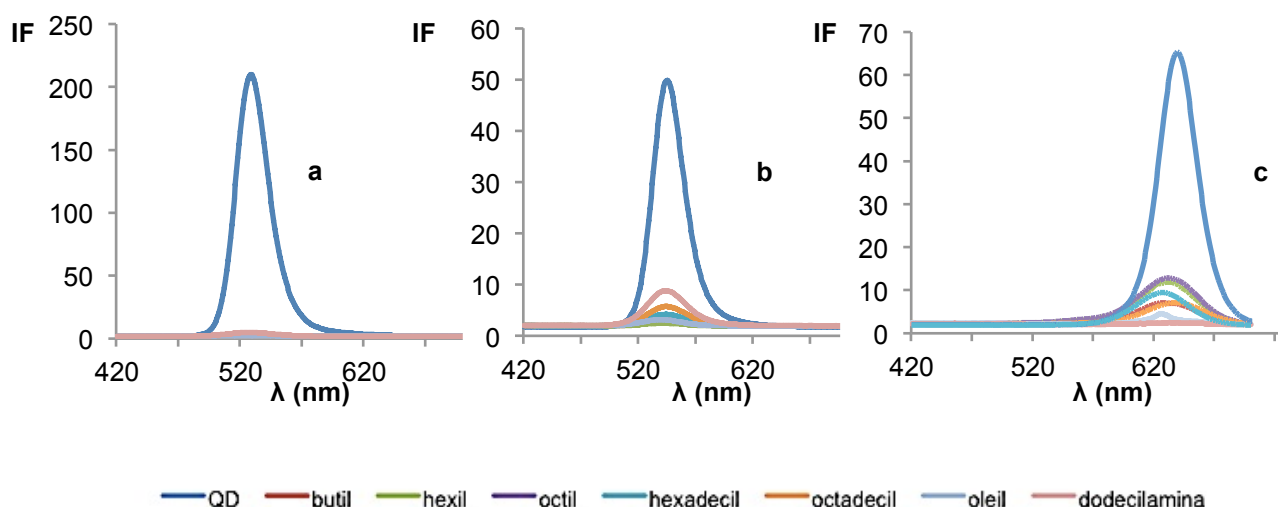


Figura 5.6 – Espectro de emissão dos QDs de GSH, antes e após conversão com as aminas: (a) 1,90 nm, (b) 2,45 nm, (c) 3,33 nm

5.2.1.1 Tempo de reação

O tempo da reação foi um dos primeiros parâmetros a ser investigado, nomeadamente o tempo de reação do éster do NHS com a amina, por ser uma etapa muito demorada (duas horas, segundo a literatura) [86].

Os resultados demonstraram que a reação de ligação da amina ao QD é mais rápida que o previsto, atingindo um equilíbrio em apenas 30 minutos. Ou seja, a partir dos 30 minutos a modificação dos QDs está completa e os valores de intensidade de fluorescência que se obtêm não aumentam mais a partir deste tempo.

Assim foi possível diminuir significativamente o tempo deste processo de modificação dos QDs, garantindo o mesmo rendimento da reação.

5.2.1.2 Concentração de NHS e tamanho do QD

Posteriormente foi avaliada a influência da concentração de NHS, no processo de modificação dos QDs de MPA. Para o efeito, fixaram-se as concentrações de QD (3 mg.mL^{-1}), de EDC (20 mmol.L^{-1}) e de cada uma das aminas (40 mmol.L^{-1}), e fez-se variar a concentração de NHS (0, 10, 20 e 50 mmol.L^{-1}).

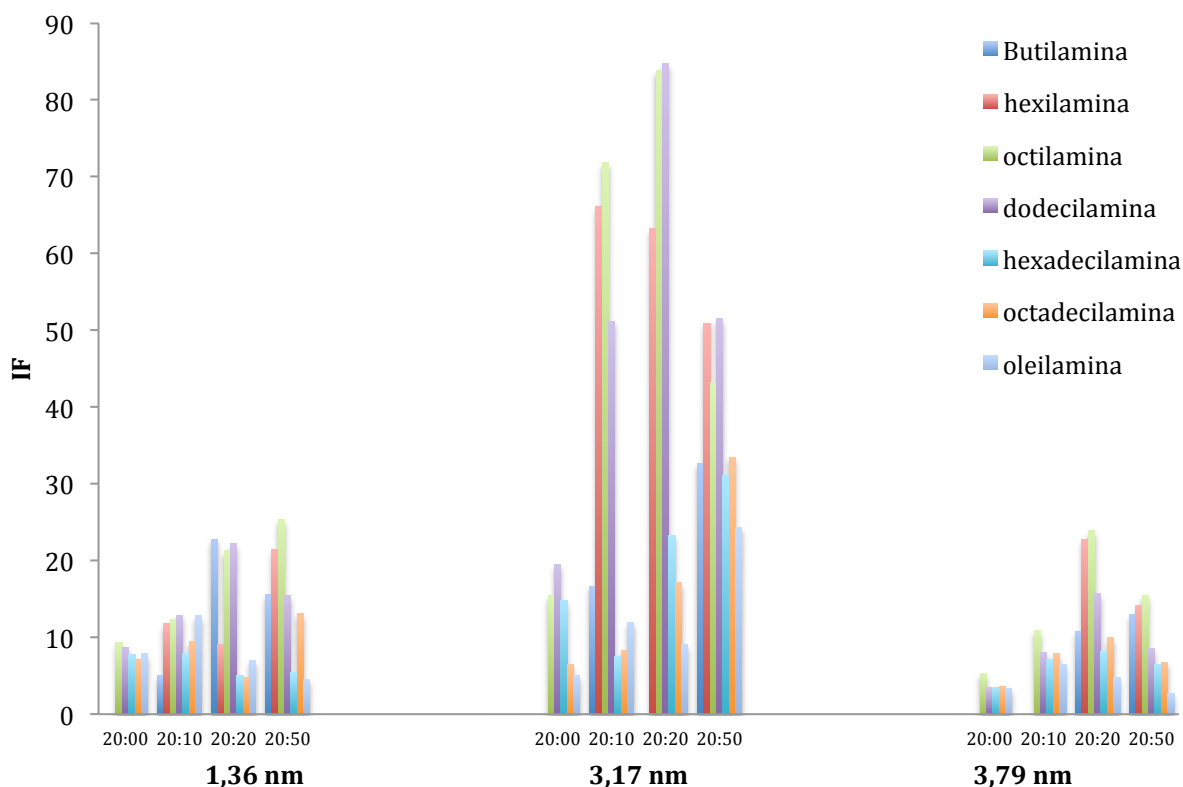


Figura 5.7 – Gráfico da Intensidade de Fluorescência para os três QDs de MPA (1,36, 3,17 e 3,79), após conversão com diferentes concentrações de NHS (0, 10, 20 e 50 mmol.L^{-1})

De acordo com os resultados obtidos, é possível retirar algumas ilações. Para todos os QDs há diminuição da fluorescência quando comparada com o QD original, ou seja, antes do processo de modificação com as aminas, isto devido a alterações que ocorrem na superfície dos QDs, e ao aumento da perda energia de forma não radiativa. Dos três QDs em estudo, o QD de 3,17 nm é aquele que possui maiores intensidades de fluorescência (IF) após modificação, principalmente quando esta é efetuada com as aminas hexilamina, octilamina ou dodecilamina. Apresenta por isso menor diminuição da fluorescência quando comparada com o QD original.

Em relação ao QD de menor tamanho (cerca de 1,36 nm), os resultados são um pouco inconstantes, sendo por isso mais difícil interpretar o seu comportamento, além de

que a fluorescência é muito baixa. Comportamento semelhante foi observado para o QD com 3,79 nm de diâmetro.

De um modo geral, para os três tamanhos de QDs estudados, são as aminas primárias de 6, 8 e 12 carbonos as que permitem obter nanopartículas com IF mais elevadas.

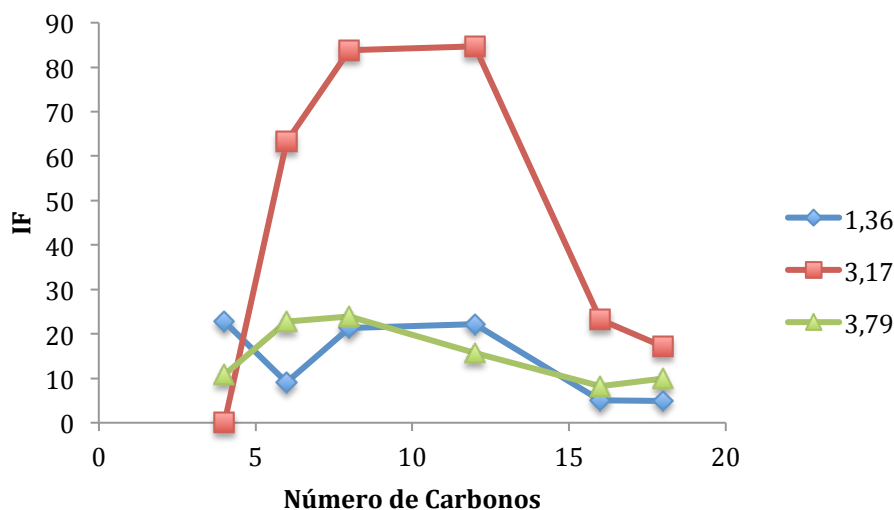


Figura 5.8 – Gráfico da Intensidade de fluorescência, dos três QDs, em relação ao número de carbonos da amina utilizada. EDC:NHS= 20:20

Por outro lado as aminas maiores geram sempre nanopartículas com baixa capacidade de emissão.

Os resultados obtidos confirmam a importância do NHS, uma vez que a sua presença no meio de reação favorece o processo de conversão dos QDs. Na sua ausência são obtidos os valores de fluorescência mais baixos, para os três QDs, e em nenhum dos casos a modificação ocorre com a butilamina ou hexilamina. Verifica-se um incremento da fluorescência quando se passa para concentrações de NHS de 10 mmol.L^{-1} e mais ainda quando se usam concentrações de 20 mmol.L^{-1} . Para concentrações superiores deste composto, ou seja os 50 mmol.L^{-1} , apesar de se obterem também bons sinais, não são suficientemente bons que justifiquem o uso de maiores quantidades deste reagente.

Deste modo, a concentração ideal a usar, de modo a garantir o melhor rendimento neste processo de modificação da superfície dos QDs de MPA, será de 20 mmol.L^{-1} de NHS.

5.2.1.3 Concentração de Amina

Uma outra variável que também foi analisada foi a concentração da amina. Neste caso já só se utilizou o QD de 3,17 nm, por ser o único que possuía boa intensidade de fluorescência, com três aminas - hexilamina, octilamina e dodecilamina - acarretando portanto menor perda de fluorescência para o QD.

Deste modo, para cada uma das aminas foram testadas três concentrações diferentes, 20, 40 e 60 mmol.L⁻¹, como mostram os seguintes gráficos:

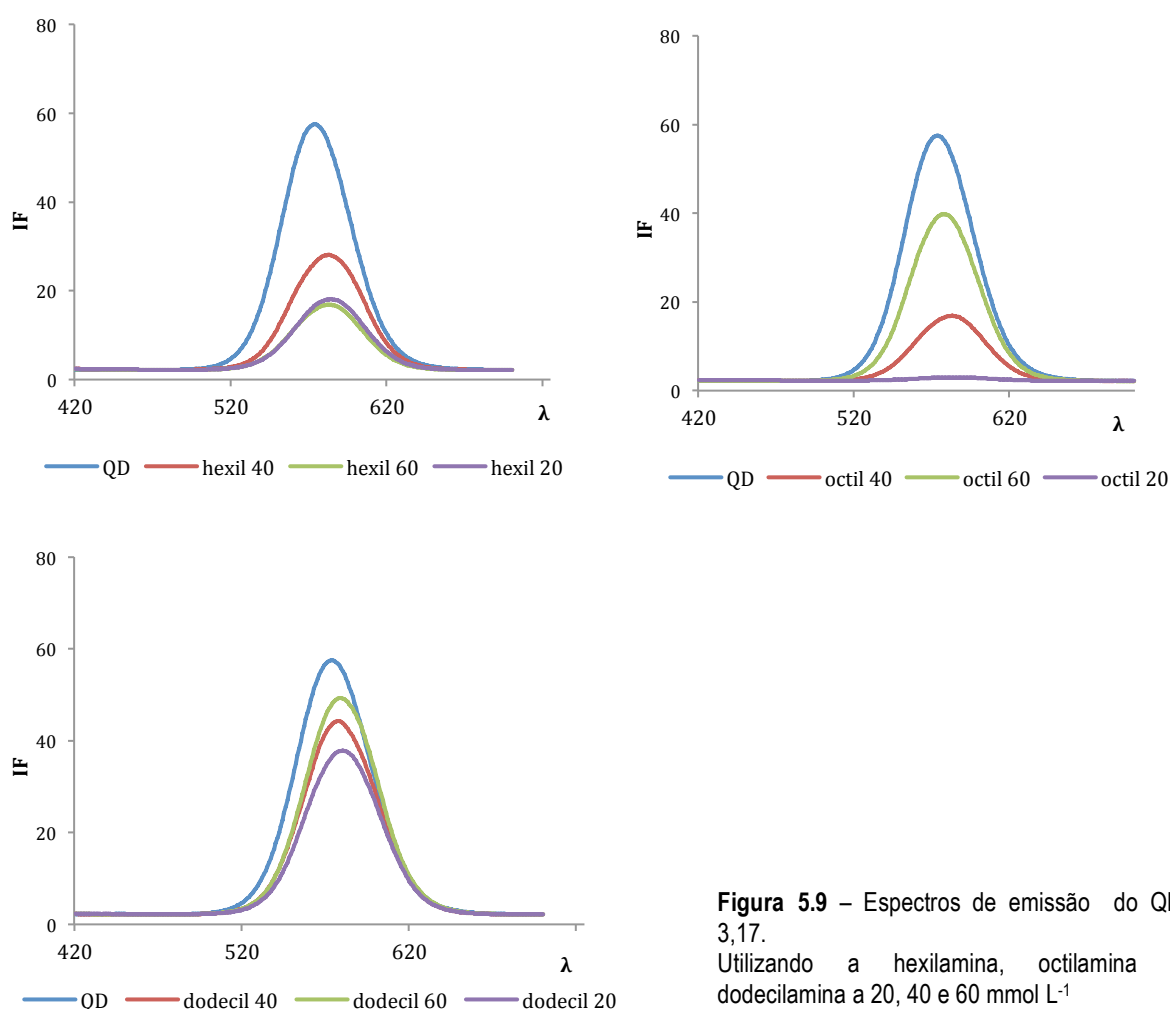


Figura 5.9 – Espectros de emissão do QD 3,17. Utilizando a hexilamina, octilamina e dodecilamina a 20, 40 e 60 mmol L⁻¹

No caso da modificação da superfície dos QDs com octilamina ou dodecilamina, a utilização de concentrações superiores, 60 mmol.L⁻¹, permitiu obter sinais analíticos mais elevados. Em relação á amina menor (hexilamina), são obtidos valores de fluorescência superiores para uma concentração de 40 mmol.L⁻¹, não trazendo benefícios em termos de sinal a utilização de concentrações mais altas desta amina. Verifica-se também que a dodecilamina é aquela que permite obter QDs com maiores intensidades de fluorescência.

5.2.1.4 pH

Três valores diferentes de pH foram testados, 6, 7 e 8. Neste caso voltaram a testar-se as três aminas selecionadas, usando a octilamina e a dodecilamina numa concentração de 60 mmol.L^{-1} e a hexilamina a 40 mmol.L^{-1} .

O que se verificou para todos os casos sem exceção foi a perda de fluorescência quando comparado com o processo de modificação feito na ausência de tampão. Notando-se também uma tendência para diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento do pH. Como se pode confirmar nos gráficos seguintes:

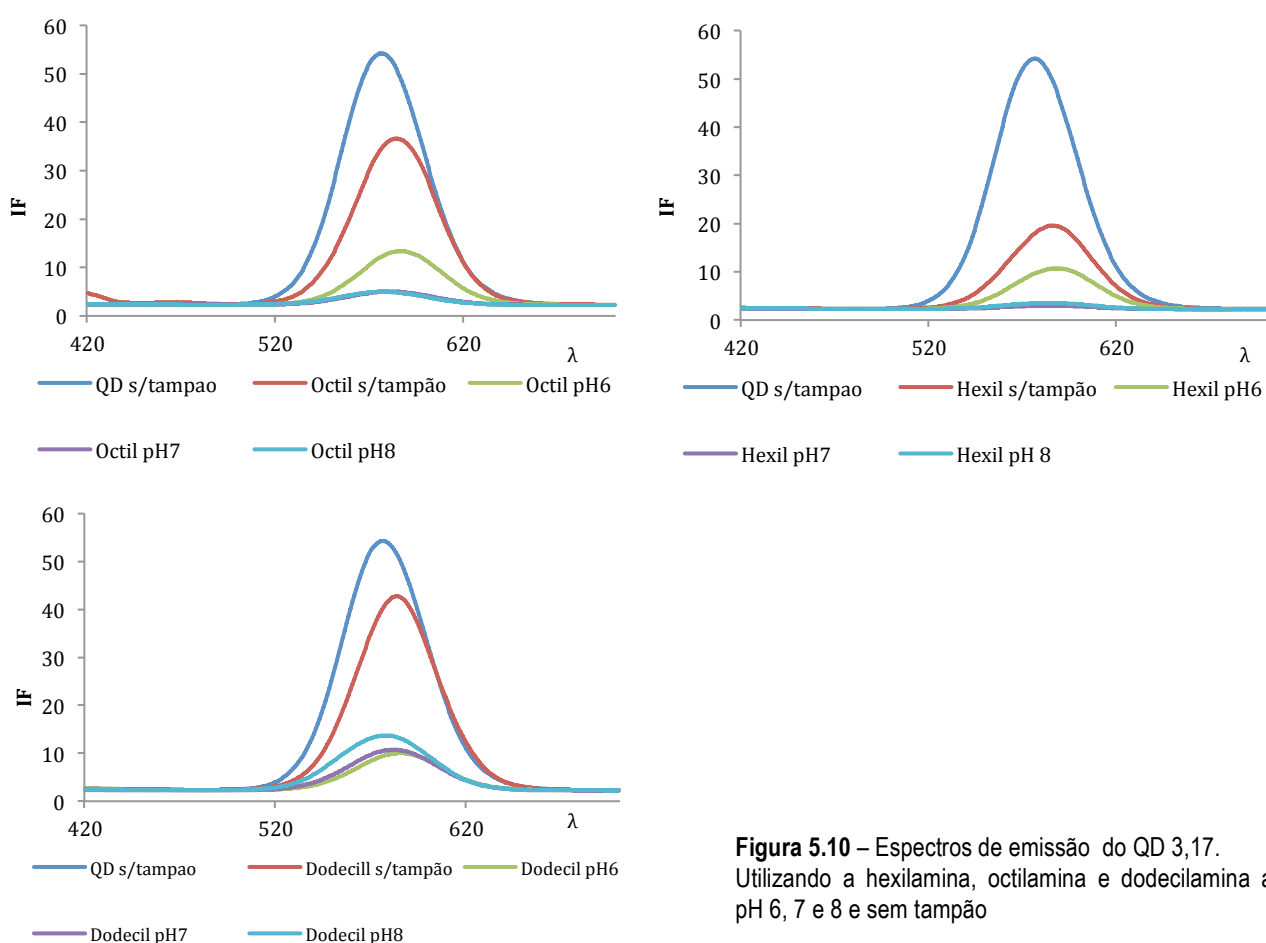


Figura 5.10 – Espectros de emissão do QD 3,17. Utilizando a hexilamina, octilamina e dodecilamina a pH 6, 7 e 8 e sem tampão

É facilmente perceptível que é preferível trabalhar sem recorrer a tampões, e que a dodecilamina é a amina que permite obter QDs com revestimento orgânico com melhores intensidades de fluorescência.

5.2.1.5 Proporção de EDC e NHS

Mantendo a proporção de EDC:NHS em uso (1:1), fez-se variar as suas concentrações. Ou seja, foram efectuados três novos testes, com EDC:NHS 10:10, 20:10 e 40:40 mmol.L⁻¹, utilizando a dodecilamina a 60 mmol.L⁻¹.

A figura 5.11 demonstra os resultados obtidos. Utilizando a concentração mais baixa, 10:10, nem sequer ocorre a formação de precipitado, ou seja, não há modificação da superfície dos QDs uma vez que não há alteração de solubilidade. Como se verifica no gráfico, a intensidade de sinal para 20:20 ou 40:40 é praticamente a mesma, ou seja, o aumento da concentração destes reagentes não é favorável.

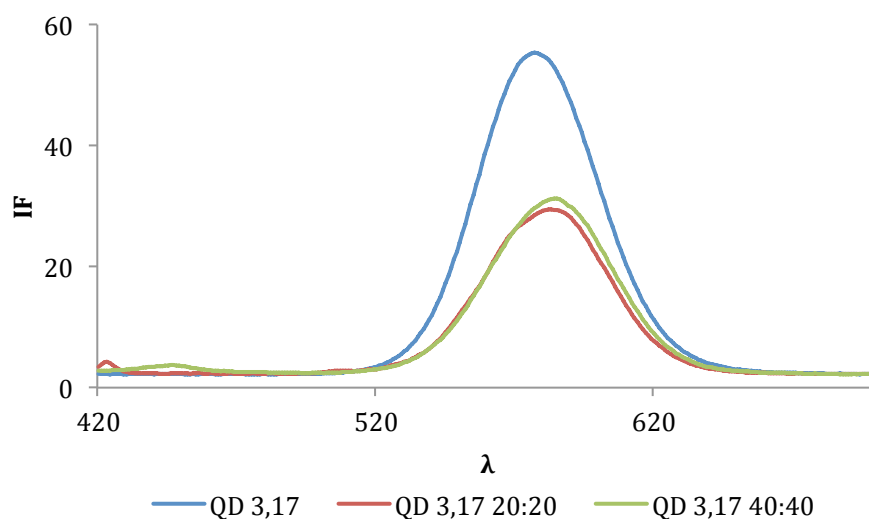


Figura 5.11 – Espectro de emissão do QD 3,17, utilizando diferentes quantidades de EDC e NHS

5.2.2 Solubilidade

Após secagem em vácuo, a solubilidades destes novos QDs foi testada. Vários solventes orgânicos foram ensaiados tais como: metanol, etanol, propanol, DMSO, diclorometano e clorofórmio. De todos estes, o clorofórmio foi o que demonstrou melhor capacidade de solubilizar os QDs.

A figura 5.12 demonstra a solubilidade do QD em clorofórmio, com base na observação da intensidade de fluorescência registada quando se dissolvem quantidades crescentes do QD recém-modificado, neste solvente.

Esta alteração da solubilidade, ou seja, o facto de o QD deixar de ser solúvel em água para passar a ser solúvel num solvente orgânico, o clorofórmio, é causada pelo facto de serem adicionadas á superfície do cristal cadeias alifáticas relativamente compridas (12 átomos de carbono) que conferem hidrofobicidade aos QDs.

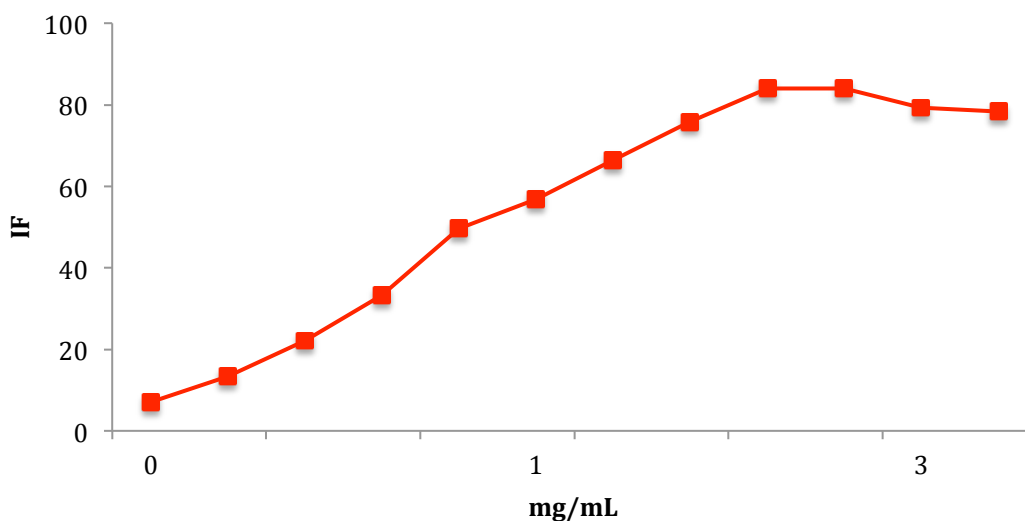


Figura 5.12 - Gráfico da solubilidade do QD modificado em clorofórmio

5.3. Aplicação

Existem vários tipos de interações possíveis entre os QDs e os analitos, como por exemplo a ligação direta do analito à superfície da nano partícula, interações electrostáticas entre um grupo funcional do analito e do ligando do QD, interação com QDs marcados e interações não covalentes na superfície do QD. São estas interações que alteram a emissão do QD podendo, por exemplo, diminuir, como é o caso do atenolol, a sua intensidade de fluorescência. ⁽⁸⁰⁾

A presença de grupos funcionais na estrutura do atenolol que possam ter alguma afinidade para a superfície do QD, parece ser o necessário para que ocorra interação entre o analito e o QD.

Os mecanismos propostos para explicar o abaixamento na intensidade de fluorescência, ou seja, o *quenching* do QD, envolvem a transferência de eletrões foto-induzida, transferência de carga e transferência ressonante de energia de fluorescência.

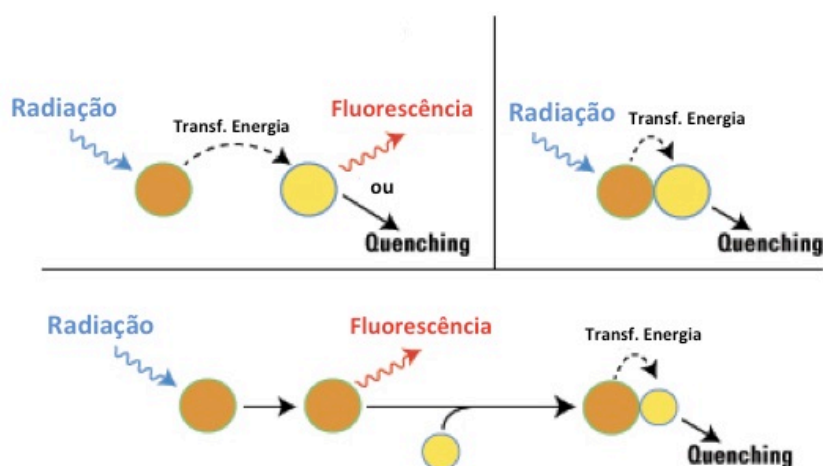


Figura 5.13 – Esquema dos tipos de *quenching* [88]

5.3.1 Ensaios preliminares

É extremamente importante ter em conta a influência da concentração dos QDs, uma vez que esta afecta não só a intensidade de fluorescência como também a reatividade e sensibilidade dos QDs bem como a zona de resposta linear.

Estudos preliminares revelaram que o atenolol interagiu com os QDs de CdTe após a sua conjugação com a dodecilamina, promovendo uma diminuição na sua fotoluminescência e que esta diminuição de fluorescência está directamente relacionada com a quantidade de atenolol e de QD.

Inicialmente foram por isso conduzidos ensaios discretos (*batch*), envolvendo a medição da fluorescência da solução de nanocristal, de modo a valiar a interacção entre os QDs alterados e o atenolol. Foi testada uma gama de concentrações do QD que variou desde os 0,25 mg.mL⁻¹ a 1,5 mg.mL⁻¹, para concentrações de atenolol que variaram dos 0,1 mmol.L⁻¹ até aos 8 mmol.L⁻¹.

A concentração de 0,75 mg.mL⁻¹ de QD foi a seleccionada para realizar a determinação, por ser aquela que apresentava uma maior diminuição da fluorescência.

O estudo do tempo da reacção foi efetuado através da avaliação da intensidade de fluorescência medida em ciclos de 10 minutos durante 1 hora de modo a analisar a evolução da reacção. Verificou-se que passados cerca de 15 minutos a diminuição da intensidade da fluorescência já era significativa.

5.3.1.1 Interferentes

Em análise farmacêutica é importante testar também a seletividade do método em relação aos excipientes que existem nas preparações farmacêuticas. No entanto, na maior parte dos casos, estes componentes não interferem.

De maneira a verificar a seletividade desta metodologia, foi avaliada a influência dos excipientes presentes nas formas farmacêuticas em estudo. Para isso a amostras com uma quantidade fixa de atenolol (1 mg.mL^{-1}) foram adicionadas concentrações crescentes dos compostos em análise, e foi medida a variação da intensidade de fluorescência. Foram testados apenas aqueles solventes que apresentam alguma solubilidade no solvente em uso, o clorofórmio. Verificou-se que estes, nomeadamente o carbonato de magnésio e o estearato de magnésio, não provocaram variações significativas na intensidade de fluorescência em relação aos valores obtidos na sua ausência.

5.3.2. Análise química das formulações farmacêuticas

De acordo com as condições experimentais otimizadas, procedeu-se á aplicação do procedimento para determinar a quantidade de atenolol presente em três formulações comerciais: Tenormin[®], Tenormin Mite[®] e Atenolol Ratiopharm[®], que declaram conter respectivamente 100, 50 e 50 mg de atenolol.

Obteve-se então uma zona de resposta linear para concentrações de atenolol entre 0,1 e 6 mmol L⁻¹.

Foi possível traçar a respectiva curva de calibração para cada tempo, como se demonstra na tabela seguinte, onde estão descritas as equações de cada curva bem como o respetivo coeficiente de correlação:

Tabela 5.2 – Equação e Coeficiente de correlação das rectas de calibração
A = intensidade de fluorescência e $x = \text{Log}(1/C)$, em que C é a concentração de atenolol expressa em mM

Tempo (min)	Equação da curva	Coeficiente de correlação (n = 4)
1	$A = 22,256 x + 551,53$	0,96807
5	$A = 22,105 x + 518,97$	0,98349
10	$A = 40,175 x + 461,7$	0,99882
15	$A = 67,484 x + 414,42$	0,99876

De acordo com estes dados, é possível por extrapolação determinar a concentração de analito em causa nas três formulações analisadas. Os resultados obtidos são demonstrados na tabela 6.

Tabela 5.3 – Resultados obtidos na determinação do atenolol em três formulações farmacêuticas

Amostra	Dosagem declarada (mg/formulação)	Concentração encontrada (mg/formulação)	Desvio Relativo (%)
Tenormin	100	100,99	0,99
Tenormin Mite	50	50,22	0,44
Atenolol Ratiopharm (MG)	50	53,72	7,44

É possível verificar que realmente o QD apresenta sensibilidade para o analito em causa e que este novo método permite determinar a concentração do atenolol nestas preparações farmacêuticas, com um desvio relativo percentual não significativo.

6. Conclusão

A nanotecnologia é uma ciência relativamente recente, que tem despertado o interesse científico devido às inovadoras aplicações que permite, além de ser uma área muito abrangente, podendo ser utilizada das mais diversas formas para variados fins. Os nanomateriais, que são matérias com dimensões à escala nanométrica, ou seja, na ordem de 1 a 100nm, são materiais cujas propriedades são muito distintas daquelas do material convencional ou *bulk*, principalmente devido ao seu reduzido tamanho e a efeitos quânticos. Aqui incluem-se os QD, os nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, entre outros.

Os QD são nanomateriais semicondutores que tem despertado muito interesse junto da comunidade científica, tendo sido alvo de extensa pesquisa principalmente devido à possibilidade de os bioconjugar e das suas potenciais aplicações biológicas. As suas propriedades eletrónicas e óticas únicas, dependentes do tamanho, a sua luminescência regulável e fotoestabilidade, tornam-nos alternativas vantajosas às tecnologias atualmente existentes.

A nanotecnologia pode ser utilizada ao nível ambiental, ao nível da monitorização de águas, solos, ar e plantas, bem como em processos de remediação da poluição destes. Estes recursos naturais são fundamentais para a vida além de serem altamente importantes no desenvolvimento socioeconómico.

A água é provavelmente dos recursos mais afetados, essencialmente devido à atividade humana, e a sua monitorização reveste-se de especial importância quando esta é destinada ao consumo humano. Por outro lado, as águas residuais necessitam de ser tratadas antes de serem novamente lançada no ambiente, sendo portanto necessário a supervisão dos processos de tratamento de modo a garantir que aquando do seu lançamento nos ecossistemas estão realmente livres de contaminantes. Uma vez que a água é um suporte essencial dos ecossistemas, da sociedade e vida humana, é muito importante garantir a sua qualidade, através da sua monitorização constante. Por outro lado, a contaminação dos solos pode acarretar graves consequências para os animais, plantas e até mesmo para as águas, superficiais e subterrâneas.

A emissão de poluentes para o ar atmosférico, como resultado maioritariamente de atividades humanas, tem como consequência que estes se possam espalhar no ambiente podendo acarretar graves prejuízos, não só para a saúde humana como também para todos os ecossistemas. As espécies vegetais têm também que ser monitorizadas porque além de terem a capacidade de captar e acumular químicos, são também extensivamente usadas em alimentos, bebidas e outros produtos usados pelos seres humanos.

Dos poluentes ambientais mais comuns são de destacar os pesticidas, micotoxinas, metais pesados, compostos orgânicos, produtos farmacêuticos e tensioativos. Para alguns destes compostos o seu uso mantém-se apesar da sua comprovada toxicidade, devido às vantagens que apresentam.

Por todos estes motivos, a monitorização do ar, solo e água, para controlo de poluentes ambientais perigosos, é cada vez mais importante principalmente de modo a proteger o ambiente e a saúde pública. Para além do impacto, que os poluentes, naturais ou industriais, orgânicos ou inorgânicos, possam causar na saúde humana e no ambiente, existem ainda os problemas económicos e financeiros, sendo por isso essencial o desenvolvimento de metodologias que permitam o controlo eficaz destes compostos.

No decorrer deste trabalho foram sintetizados QDs de CdTe funcionalizados com MPA e com GSH, com boas propriedades fluorescentes, com largura de banda a meia altura relativamente estreita e um comprimento de onda de emissão facilmente ajustável por variação do tamanho do cristal. Os QDs de MPA demonstraram ser, sob determinadas condições, mais sensíveis ao processo de modificação da sua superfície. Este processo, altera a solubilidade destes QDs, ao acrescentar cadeias alifáticas na sua superfície, o que diminuiu a sua solubilidade em água para os tornar mais solúveis em solventes orgânicos. Deste modo é possível obter nanocristais hidrofóbicos, sem necessidade de recorrer às condições extremas exigidas pela síntese orgânica, que podem ser utilizados na determinação de compostos com reduzida, ou nenhuma, solubilidade em água.

O método analítico aqui proposto, baseado no efeito de *quenching* do atenolol na fluorescência dos QDs de CdTe-MPA modificados, demonstra ser eficaz na determinação deste composto. Este método apresenta algumas vantagens em relação às metodologias frequentemente utilizadas na determinação de compostos farmacêuticos, como o HPLC, por não requerer equipamento de elevado custo, além de o seu procedimento ser de implementação bastante simples, constituindo uma alternativa vantajosa para a análise deste tipo de compostos em amostras ambientais.

7. Referências Bibliográficas

1. United States National Nanotechnology Initiative: *Nanotechnology 101*. Acedido em Setembro de 2012, em: <http://www.nano.gov/nanotech-101>
2. Allhoff, Fritz; Lin, Patrick; Moore, Daniel (2010). *What is nanotechnology and why does it matter?: from science to ethics*. John Wiley and Sons. pp. 3–5
3. Royal Society and Royal Academy of Engineering (2004): *"Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties"*. Acedido em Setembro de 2012, em: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>
4. Fortunato, Elvira, *As metas da nanotecnologia: Aplicações e Implicações*. Centro de Investigação de Materiais, Janeiro 2005
5. Adans, F.C., Barbante, C. (2013). *Nanoscience, nanotechnology and spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B
6. Mangematin, V., Walsh, s. (2012). *The future of nanotechnologies*, Technovation, pp. 157-160
7. Michelson, E. S. (2008). *Globalization at the nano frontier: The future of nanotechnology policy in the United States, China and India*, Technology in Society, pp. 405-410
8. Nanotecnologia – Introdução. Disponível em http://nanotech.ica.ele.puc-rio.br/nano_introducao.asp [acedido em 29/08/2014)
9. Stone, V., Nowack, B., et al (2009). *Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation*, Science of the Total Environment, pp. 1745-1754
10. Comissão Europeia: *Nanomaterials*. Acedido em Dezembro de 2012, em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/>

11. Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. (2007). *"Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity"*. Biointerphases
12. Birol, H., et al (2013). *"Preparation of ceramic nanoparticles via cellulose-assisted glycine nitrate process: a review"*, The Royal Society of Chemistry, pp. 2873-2884
13. Zhang, Y., Wang, T. (2012) *Quantum Dot Enabled Molecular Sensing and Diagnostics*, Theranostics, pp. 631-650
14. Tomczak, N., et al (2009) *Designer polymer-quantum dot architectures*, Progress in Polymer Science, pp. 393-430
15. Drbohlavova, J. et al (2009), *Quantum Dots – Characterization, preparation and usage in biological systems*, International Journal of Molecular Sciences, pp. 656-673
16. Menezes, F. D. (2007). *Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II-VI para Fins de Aplicação como Biomarcadores*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Química Fundamental, Recife, 117 pp.
17. Frigerio, C., et al (2012), *Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review*. Analytica Chimica Acta, pp. 9-22
18. Mendonça, MC. *Síntese e Caracterização de Quantum Dots de CdTe* [dissertação]. Porto: Universidade de Ciências da Universidade do Porto; 2008
19. Jamieson, T. et al. (2007) *Biological Applications of Quantum Dots*. Biomaterials, 28 (31), pp.4717-4732
20. Silvestre, C. I. C., et al., (2011) *Quantum dots assisted photocatalysis for the chemiluminometric determination of chemical oxygen demand using a single interface flow system*. Analytica Chimica Acta, 699(2), pp. 193-197
21. Research. Disponível em <http://nanocluster.mit.edu/index.php> [acedido em 17/05/2013]

22. Fontes, A. Et al. (2012) *Quantum Dots in Biomedical Research*, Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine, pp. 269-290
23. Geske-Moritz, M., Moritz, M. (2013) *Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties*, Materials Science and Engineering C.
24. Azzazy, H. M. E., Mansour, M.M.H., Kazmierczak, S.C. (2007) *From diagnostics to therapy: Prospects of Quantum dots*, Clinical Biochemistry, pp. 917-927
25. Zou, I., et al (2008) *Ultrafast synthesis of highly luminescent green-to near infrared- emitting CdTe nanocrystals in aqueous phase*, Journal of Materials Chemistry, pp. 2807-2815
26. Qian, H., et al (2006) *Facile one-pot synthesis of luminescent water-soluble, and biocompatible glutathione-coated CdTe nanocrystals*, Small Journal, pp. 747- 751
27. Sheng, Z., et al (2010) *One-step growth of high luminescence CdTe quantum dots with low cytotoxicity in ambient atmospheric conditions*, The Royal Society of Chemistry, pp. 7017-7020
28. Schatkoski, V.M. (2011), *Síntese e caracterização de nanopartículas semicondutoras com estrutura tipo “nucleo/casca” CdMn 1-xS/CdSe obtidas por rota coloidal aquosa*. Tese de Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais,
29. Yu, W.W., et al (2003), *Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals*, American Chemical Society, pp. 2854-2860
30. Ashby, M.F., Ferreira, P.J., Schodek, D.L. (2009), *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design*. Butterworth-Heinemann, Oxford
31. Rassaei, L., et al (2011), *Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring*. Trend in Analytical Chemistry, pp.1704-1714
32. Rickerby, D.G., Morrison, M. (2007), *Nanotechnology and the environment: a European perspective*. Science and Technology of Advanced Materials, pp. 19-24

33. Sustich, R.C., Shannon, M., Pianfetti, B. (2009), *Nanotechnology Applications for Clean Water*. William Andrew Inc. Illinois, EUA

34. Bartram, J., Balance, R., (1996), *Water Quality Monitoring – A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. E FN Spon. Londres

35. Strobl, R.O., Robillard, P.D. (2007), *Network design for water quality monitoring of surface freshwaters: A review*. Journal of Environmental Management, pp. 639-648

36. Storey, M.V., Gaag, B., Burns, B.P. (2011), *Advances in on-line drinking water quality monitoring and early warning systems*. Water Research, pp. 741-747

37. Allan, I.J. et al (2006), *A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive*. Talanta, pp.-302-322

38. World Health Organization: *Water Sanitation and Health*. Acedido em Março de 2013, em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publication_9789241562638/en/index.html

39. Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M. (1998), *Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques*, FEMS Microbiology Ecology, pp. 205-215

40. Sonune, A., Ghate, R. (2004), *Developments in wastewater treatment methods*. Desalination, pp. 55-63

41. GE Power and Water. Water and Process Technologies: *Monitoring and control of water treatment*. Acedido em Maio de 2013, em: http://www.gewater.com/handbook/chemical_feed_control/ch_36_monitoring.jsp

42. Jensen, A.L. (1999), *Trends in monitoring of waste water systems*. Talanta, pp. 707-716

43. Morais, L.A. (1993), *Industria Ambiente*, 1ª edição
44. Thomas, O., *et al* (1997), *Wastewater quality monitoring*. Trends in Analytical Chemistry, pp. 419-425
45. Tschmelak, J., *et al* (2005), *Automated water analyser computer supported system*. Biosensors and Bioelectronics, pp. 1509-1519
46. Confagri: *Importância do solo e suas funções*. Acedido em Maio de 2013, em: <http://www.confagri.pt/Ambiente/AreasTematicas/Solo/TextoSintese/Antecedentes/Pages/default.aspx>
47. Morvan, X., *et al* (2008), *Soil monitoring in Europe: A review of existing systems and requirements for harmonization*. Science of the Total Environment, pp. 1-12
48. Duijvenbooden, W. (1998), *Soil monitoring systems and their suitability for predicting delayed effects of diffuse pollutants*. Agriculture, Ecosystems and Environment, pp. 189-196
49. Gil-Sotres, F., *et al* (2005), *Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties*. Soil Biology and Biochemistry, pp. 877-887
50. Shukla, M.K., Lal, R., Ebinger, M. (2006), *Determining soil quality indicators by factor analysis*. Soil and Tillage Research, pp. 194-204
51. Karlem, D.L. *et al* (1997), *Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation*. Soil Science Society of America Journal, pp. 4-10
52. Vandenberg, J.J. (2004), *The role of air quality management programs in improving public health: A brief synopsis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, pp. 334-336
53. Amann, M., Lutz, M. (2000), *The revision of the air quality legislation in the European Union related to ground-level ozone*. Journal of Hazardous Materials, pp. 41-62

54. World Health Organization: *Air quality guidelines: Global update*. Acedido em Maio de 2013, em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/pre2009/air-quality-guidelines.-global-update-2005.-particulate-matter,-ozone,-nitrogen-dioxide-and-sulfur-dioxide>
55. Geelen, L.M.J., et al (2009), *Confronting environmental pressure, environmental quality and human health impact indicators of priority air emissions*. Atmospheric Environment, pp. 1613-1621
56. Knox, A., et al (2013), *The expanding scope of air pollution monitoring can facilitate sustainable development*, Science of the Total Environment, pp. 189-196
57. Lozano, A. et al (2010), *Optimization of the design of air quality monitoring networks and its application to NO₂ and O₃ in Jaen, Spain*. Microchemical Journal, pp. 406-411
58. Ferradas, E.G., et al (2010), *An approach for determining air pollution monitoring sites*. Atmospheric Environment, pp. 2640-2645
59. Thackway, R., et al (2207), *Vegetation information for improved natural resource management in Australia*. Landscape and Urban Planning, pp. 127-136
60. Godinez_alvarez, H., et al (2009), *Comparison of three vegetation monitoring methods: Their relative utility for ecological assessment and monitoring*. Ecological Indicators, pp. 1001-1008
61. Margui, E., Hidalgo, M., Queralt, I. (2005), *Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: Possibilities and drawbacks*. Spectrochimica Acta, pp. 1363-1372
62. Warren, N. et al (2003), *Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environment – a review*. Applied Geochemistry, pp. 159-194

63. Boer, J., *et al* (2008), *United Nations Environment Program capacity building pilot project – Training and interlaboratory study on persistent organic pollutant analysis under the Stockholm Convention*. *Analytica Chimica Acta*, pp. 208-215
64. Mas, S., *et al* (2010), *Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: a review*. *Talanta*, pp. 1052-1067
65. Diaz-Cruz, M.S., Alda, M.J.L., Barceló, D. (2003), *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 340-350
66. Beausse, J. (2004), *Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances*. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 753- 760
67. Santos, L.H.L.M., *et al* (2010), *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. *Journal of Hazardous Materials*, pp. 45-95
68. Kummerer, K. (2009), *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges*. *Journal of Environmental Management*, pp. 2354-2366
69. Kummerer, K. (2001), *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewaters by hospitals in relation to other sources – a review*. *Chemosphere*, pp. 957-969
70. Cooper, E.R., Siewicki, T.C., Phillips, K. (2008), *Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment*. *Science of the Total Environment*, pp. 26-33
71. Halling-Sorensen, B., *et al* (1997), *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review*. *Chemosphere*, pp. 357-393
72. Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B. (2013), *Spatial and temporal occurrence of pharmaceutical and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments*. *Science of the Total Environment*, pp. 442-456

73. Garcia, S.O. *et al* (2013), *Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain*. Science of the Total Environment, pp. 451-465
74. Bortolotto, LA, Colombo, FMC (2009), *Betabloqueadores adrenérgicos – artigo de revisão*, Revista Brasileira de Hipertensão, 16 (4), pp.215-220
75. Stapleton, MP (1997), *Sir James Black and Propranolol. The Role of the Basic Sciences in the History of Cardiovascular Pharmacology*, Texas Heart Institute Journal, s4 (4), pp. 336-342
76. Aparecida, F. *et al* (2001) *Beta-bloqueadores em anestesiologia: aspectos farmacológicos*, Revista Brasileira de Anestesiologia, 51 (5) 431-447
77. Veloutsou, S., Bizani, E., Fytianos, K. (2014) *Photo-Fenton Decomposition of β -blockers Atenolol and Metoprolol; Study and Optimization of System Parameters and Identification of Intermediates*, Chemosphere, 107, pp.180-186
78. Maszkowska, J., *et al* (2014) *Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis study*, Science of the Total Environment
79. Maszkowska, J., *et al* (2014) *Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study*, Science of the Total Environment
80. Arvand, M., Vejdani, M., Moghimi, M. (2008) *Construction and performance characterization of an ion selective electrode for potentiometric determination of atenolol in pharmaceutical preparations*, Desalination, 225, pp. 176-184
81. Zeng, C. *et al* (2012) *The role of dissolved organic matters in the aquatic photodegradation of atenolol*, Journal of Hazardous Materials, 239.240, pp. 340-347

82. Merck, *The Merck Index*, 13^a edição, Whitehouse Station, 2001, pp. 2564
83. Goyal, RN, *et al* (2006) *Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode*, *Electrochemistry Communications*, 8, pp. 65-70
84. Cervini, P. *et al* (2007) *Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode*, *Talanta*, 72, pp. 206-209
85. Gaponik N, *et al* (2002). *Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes*. *J Phys Chem*, 106 (29): 7177-85.
86. Carrillo-Carrión, C., *et al* (2011) *Colistin-functionalised CdSe/ZnS quantum dots as fluorescent probe for the rapid detection of Escherichia coli*, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, pp. 4368-4374
87. NHS and Sulfo-NHS, Disponível em <http://www.piercenet.com/product/nhs-sulfo-nhs> [acedido em 24/03/2014]
88. Fluorescent Probes, Disponível em <http://www.piercenet.com/method/fluorescent-probes#ballou> [acedido em 12/08/2014]